Aus der I. Inneren Abteilung des Städt.Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM,
München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

"Vergleichende Untersuchungen zur Proliferationskinetik des Knochenmarks in Koagulum- und Suspensionskulturen."

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
ehem. Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Ehrlich
aus Arnstadt/Th.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EUTATOM-GSF,
Nr. 031-64-1 BIAD.

1970

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt.Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM,
München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

"Vergleichende Untersuchungen zur Proliferationskinetik des Knochenmarks in Koagulum- und Suspensionskulturen."

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
ehem. Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Ehrlich
aus Arnstadt/Th.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EUTATOM-GSF,
Nr. 031-64-1 BIAD.

ehem.Dekan: Professor Dr.med.Herbert L a x

Referent: Professor Dr.med.Irene B o l l

Korreferent: Professor Dr.med.Horst B r ü c h e r

Gedruckt mit Genehmigung der ehem.Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 14. Oktober 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Das Überleben der Blutzellen außerhalb des Körpers wurde schon seit langem untersucht. 1910 gelang es JOLLY, die Bewegungen von Froschleukozyten in kühl gelagertem Blut über einige Wochen zu verfolgen. Mit der Perfektionierung der Gewebekulturtechnik eröffnete sich in der Hämatologie die Möglichkeit, die Morphologie und die Proliferation des myeloischen Systems zu erforschen. Seit den ersten Arbeiten von CARREL und von BURROWS (1910) und LEWIS und LEWIS (1911) sind an Blut und Knochenmarkzellen in vitro mit verschiedenen Züchtungsmethoden viele Informationen erhalten worden.

Bei den heute gebräuchlichen Knochenmark-Züchtungsmethoden finden sich zwei grundlegend verschiedene Verfahren: Bei der Flüssigkeitskultur werden losgelöste Zellen in einem flüssigen Nährmedium gezüchtet. In stationären Kulturen ist das Wachstum von der Dichte der Zellpopulation und der Tiefe des Nährmediums abhängig. Durch Bewegen der Zellen in ihrem Medium können diese Faktoren eliminiert werden. Auf der Plasma-Koagulum-Kultur wächst das Knochenmark in Bruchstücken auf Koagula aus menschlichem, tierischem oder gemischtem Plasma, das entweder durch eine Gasphase, meistens Luft, oder von einer flüssigen Phase aus Serum, Plasma oder einem Nährmedium bedeckt ist.

Man findet nicht nur einen Unterschied der Methoden, sondern auch unterschiedliche Ergebnisse, die den Einsatz beider Züchtungsmethoden für verschiedene Fragestellungen rechtfertigen. Z.B. wurde für morphologische Studien an myeloischen oder Stromazellen vorwiegend die Koagulumkulturtechnik von FIESCHI und ASTALDI benutzt. Bei den Arbeiten, die nicht nur Differentialzählungen sondern auch eine Gesamtzahl zur quantitativen Bestimmung erfordern, bietet sich die Flüssigkeitskultur an. Auch für Lang-Zeit-Studien, z.B. um die Stromateile im Sternalmark zu

erforschen - speziell mit Rücksicht auf das myeloproliferative Syndrom, in welchem die Fibrose als Endzustand erscheinen mag - ist diese Kulturtechnik die geeignetere. Sie wurde 1936 von OSGOOD und BROWNLEE entwickelt und ist heute in mehreren Varianten bekannt.

Es wurde hier ein komplizierter Apparat entwickelt, der Lunge, Nieren und die Zirkulation für das Knochenmark ersetzen sollte. Dabei wird der O_2- und der CO_2-Druck, das pH und die Nährmedium-Zusammensetzung konstant gehalten. Der wichtigste Teil des Apparates ist eine semipermeable Membran, die die Kultur von der Hauptmenge des Mediums trennt und den Nährstoffen erlaubt, zur Kultur zu diffundieren und den Abfallprodukten herauszudiffundieren. Mit dieser Knochenmarkkulturtechnik führten OSGOOD und seine Mitarbeiter supravital Beobachtungen durch, Hb-Bestimmungen, Zählungen von Retikulocyten, Erythrocyten und von sämtlichen kernhaltigen Zellen, Peroxydasefärbungen und chemische Analysen. Das Zellmaterial aus dieser Züchtungsmethode kann für jede hämatologische und jede chemische Arbeit benutzt werden. Die Autoren fanden mit ihrer Methode drei Phasen des Wachstums: 1.) eine Vermehrung der Zellen, 2.) einen Anstieg der Zellgröße und 3.) eine Ausreifung der Zellen, und stellten fest, daß die reifen Erythrocyten die Tendenz haben, das Wachstum der anderen Zellen zu verhindern.

Eine beträchtliche Vereinfachung des Apparates wurde von PLUM eingeführt, der nur noch einen einfachen Perfusionsapparat gebrauchte.

LATTHA übernahm die Grundbestandteile der Kulturtechnik, wie sie OSGOOD entwickelt hatte, und zeigte, daß diese Kulturmethode eine genaue Gesamt- und Differentialzählung erlaubt.

Bei seiner Methode ist ein Wechsel des Mediums zur Lebensverlängerung möglich, jedoch wird dadurch gleichzeitig die absolute Zellzahl verändert. Um einen weiteren Unsicherheitsfaktor auszuschließen, verlangt er mindestens die Benutzung von Serum der gleichen Blutgruppe. Es fand sich, daß die weißen Zellen in den Kulturen viel länger überleben als die roten Zellen und das Wachstum von den frühen Zellformen bis zu den späten Formen vollständig beobachtet werden kann. Änderungen von Zahl und Zusammensetzung der weißen Zellen wurden nicht beobachtet. Bei den roten Zellen sieht man schon nach 48 h morphologische Veränderungen. Nach 72 h fanden sich weniger als 50 % morphologisch normale Zellen.

LAJTHA zog aus seinen Beobachtungen den Schluß, daß sich das in vitro gezüchtete Knochenmark dem in vivo-Verhalten von normalem Knochenmark nähert. Zwei Unterschiede von den in vivo-Bedingungen sollten aber festgehalten werden: 1.) das schnelle Absinken der Proliferationsaktivität. Nach den ersten 6 - 8 h hält die Vermehrung nicht mehr mit der Reifung Schritt, woraus eine graduelle Anhäufung später Zellformen resultiert. Es wird der Verbrauch eines für die Proliferation notwendigen Faktors diskutiert; oder aber das Fehlen eines bestimmten Zelltyps, nämlich der Reticulumzelle als omnipotente Stammzelle. Beweis für den Faktor wäre, daß durch Hühnerembryonalextrakt die Proliferation erhalten werden kann. Aber für Experimente kommen durch den Hühnerembryonalextrakt zu viele unbekannte Faktoren hinein. Der 2.) Unterschied von dem in vivo-Verhalten des normalen Knochenmarks ist die Vermehrung der orthochromatischen Erythroblasten.

BERMAN vereinfachte diese Methode noch mehr und setzte seine Flüssigkeitskulturen in großen Reagenzgläsern an. Man kann auch hier eine stetige Vermehrung der orthochromatischen Ery-

throblasten beobachten. Dieser Anstieg ist auch bei allen anderen bewegten Suspensionsmethoden zu beobachten. ALBERT beobachtete, daß bei den bewegten Suspensionskulturen der Mitoseindex sehr gering ist, und schließt daraus, daß die Bewegung für Mitosen ungünstig ist.

Die andere Möglichkeit ist die Züchtung von Knochenmark auf festen Nährböden.

Schon im Jahre 1908 benutzten LEWIS und LEWIS Nähragar zur Züchtung von menschlichem Knochenmark; sie leiteten ihre Methode von der Bakterienzüchtungsmethode ab.

WOODLIFF (1951) modifizierte die Methode und züchtete Knochenmark auf Serumagar in Plastikkammern. Der Serumagar wurde mit einem Flüssigkeitsmedium umgeben, und zwar Humanserum + Medium 199. Die Ergebnisse waren nach 24 h gut, nach 48 h lebten nur noch 50 % der Zellen, und nach 72 h - 144 h fanden sich nur noch ganz wenige morphologisch einwandfrei hämapoetische Zellen und sehr viele fibroblastoide Formen. Die Zellen reifen bei dieser Methode gewöhnlich nicht heran und die Kulturen liefern keine Ergebnisse von diagnostischem Wert.

PULVERTAFT (1956) verfeinerte die Methode, indem er dem Serumagar noch 2 % Hühnerembryonalextrakt hinzufügte, den pH durch EARLE'sche Lösung konstant hielt und 100 IE/ccm Penicillin und Streptomycin hinzusetzte. In der Mehrzahl der Kulturen wurde Patientenserum benutzt. Das Knochenmark hat der Autor zur Fortschwemmung der Erythrocyten gewaschen. Das gewaschene Teilchen wird in die Mitte des Nähragarstückchens gelegt und mit einem sterilen Deckgläschen zugedeckt. Man muß das Deckgläschen auf Paraffinpfeiler legen, damit es mit dem Agar in Kontakt tritt ohne ihn zu zermalmen. Der Erfolg dieser Methode hängt wahrscheinlich davon ab, daß die Zellen in einem kapillären Spalt

des Nährmediums von einer Dicke von 50 µ leben. Diese Methode liefert zwar gute Ergebnisse, enthält aber unbekannte Faktoren, wie den Hühnerembryonalextrakt und auch den Agar, die keine chemisch reinen Subastanzen sind und schädliche Verunreinigungen enthalten können. Der Vorteil dieser Kultur liegt darin, daß sie zur Beobachtung im Phasenkontrastmikroskop geeignet ist. Für die meisten Zellen ist diese Methode gut geeignet. Nur die Erythroblasten degenerieren häufig und die meisten sterben in Mitose, sodaß nach 48 h kaum welche in gutem Zustand überleben. 1946 entwickelten die Italiener FIESCHI und ASTALDI die Plasmakoagulumkultur-Methode. Hier wird das Knochenmarkbröckchen auf geronnenem Plasma gezüchtet. Diese Methode ist sehr gut für das Studium von Reticulumzellen, myeloischen Zellen und selbst zur Chromosomen Darstellung geeignet.

Bei allen oben angeführten Arbeiten über die verschiedenen Kulturmethoden finden sich keine vergleichenden Angaben über die verschiedenen Kulturtechniken. Aus diesem Grunde wurde die Frage aufgeworfen, ob sich die Ergebnisse der Suspensions- mit den Ergebnissen der Koagulumkulturmethode vergleichen lassen.

Wir legten uns folgende Fragen vor:

1. Findet sich nach dem Homogenisieren des Knochenmarks, wie es für die Flüssigkeitskultur erforderlich ist, ein Unterschied in der prozentualen Verteilung der Zellen und in der Mitosehäufigkeit gegen den Originalausstrich desselben Knochenmarks ?
2. Treten unter dem Einfluß der Flüssigkeits- bzw. Koagulumkulturtechnik morphologische Veränderungen an irgendeiner Zellart auf ?
3. Ändert sich die prozentuale Verteilung der Zellen in der Flüssigkeitskultur gegenüber der Koagulumkultur ?
4. Läßt sich ein Unterschied in der Mitosehäufigkeit und Mitosephasenverteilung bei den verschiedenen Kulturmethoden feststellen ?

Methode.

Für die Flüssigkeitskultur benutzten wir eine vereinfachte Methode, wie sie von LAJTHA, BERMAN, ASTALDI und TOLENTINO angegeben wird.

Die durch die Sternalpunktion gewonnenen Knochenmarkbröckchen werden in einer Heparinlösung aufgefangen. Diese Lösung enthält 30 IE Heparin in 100 ml HANK'scher Lösung.

Für die ersten drei Versuche wurde zur Herstellung der Knochenmark-Suspension ein von COLLMANN entwickelter Apparat verwendet. Es handelte sich um zwei Glaskolbenspritzen, die mit einem Teflonschlauch verbunden waren. Der Schlauch wurde durch eine Quetsche komprimiert. In 2 ml TC 199 wurde unter sterilen Kautelen das Knochenmarkbröckchen hin- und hergespritzt. Durch die Wirbelbildung an der gequetschten Schlauchstelle wurde eine gute Suspendierung des Knochenmarks erreicht.

Das Medium der Flüssigkeitskultur besteht aus 1 ml fetalem Kälberserum, 1 ml Knochenmark-Suspension, 4 ml TC 199 und 4 gtt. Penicillinlösung 1 : 4 x.

Um die Methode zu vereinfachen, wurde dann auf die Suspensionsherstellung mit Kanüle und Spritze zurückgegriffen. Das Knochenmarkbröckchen wurde in ein Blockschälchen mit 2 ml TC Medium Eagle überführt und durch eine 14'er Kanüle mit einer 2 ml Spritze unter sterilen Kautelen 2 x aspiriert und wieder ausgespritzt. Damit erreichten wir eine ausreichende Homogenisierung des Knochenmarks. Als Ansatz für die Flüssigkeitskultur wählten wir nun folgende Zusammensetzung: 5 ml TC Medium Eagle, 4 ml Eigenserum, 1 ml Zellsuspension, 7 gtt.Streptomycin-Penicillin. Das TC Medium Eagle stellt eine Verfeinerung des TC 199 dar;

es ist ohne den Indikator Phenolrot hergestellt.
Die Antibiotika-Lösung setzten wir wie folgt an: auf 100 ml HANK'sche Lösung wurden 1 g Streptomycin und 1 Mega Penicillin zugesetzt.
Zur Bebrütung wurde dieser Ansatz in CARREL'schen Flaschen bei 37° C inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h wurden die Kulturen mit 500 - 1000 U zentrifugiert und Ausstriche angefertigt, die nach PAPPENHEIM gefärbt wurden.

Die Plasma-Koagulum-Kultur war ein vereinfachtes Verfahren (BOLL) in Anlehnung an die CARREL'sche Deckglas-Methode: Zur Gewinnung von Nativplasma wird dem nüchternen Patienten morgens Blut abgenommen und in einem silikonisierten Zentrifugenglas bei 6° C steril bis zum Absetzen der Zellen aufbewahrt. Frühestens 1 h nach der Blutentnahme schließt sich die Sternalpunktion an. Die Knochenmarkbröckchen werden in einer Heparinlösung aufgefangen; diese Lösung enthält 30 IE Heparin in 100 ml HANK'scher Lösung +) (=0,3 mg %). Zur Herstellung des Koagulums werden ein Teil Corhormon 3fach verstärkt, vier Teile HANK'scher Lösung und fünf Teile Eigenplasma gemischt und einige Tropfen auf einen üblichen Objektträger gebracht. Diese Mischung gerinnt nach wenigen Minuten. Auf dieses Koagulum wird das Bröckchen Knochenmark gesetzt und mit einem kleinen Tropfen Serum bedeckt. Verschlossen wird dieser Ansatz mit einem aufgelegten 4 mm dicken Hohlschliff-Objektträger und der Rand mit flüssigem Hartparaffin luftdicht verschlossen. Die Kultur wird umgedreht und als hängender Tropfen bei 37° C bebrütet. Nach 24 h, 48 h, 72 h wird sie ausgestrichen und nach PAPPENHEIM gefärbt. Alle Arbeiten wurden unter handsterilen Kautelen ausgeführt.

+) HANK'sche Lösung:

NaCl 8.0; $CaCl_2$ (anhydricus) 0.14 ; $MgSO_4$. 7 H_2O 0.2 ; KH_2PO_4 0.06 ; Na_2HPO_4 . 2 H_2O 0.06 ; Glucose 1.0 ; Phenolrot 0.02 ; $NaHCO_3$ 0.35 ; Aqua bidest. ad 1 000.0

Es wurden insgesamt 13 Versuche mit 83 Ausstrichen angefertigt. Von jedem Ausstrich wurden jeweils 1000 Zellem differenziert und gezählt. Am Ende der Versuchsreihe hatten wir insgesamt 79 000 Zellen differenziert. Drei 72^h Kulturen waren nicht zu differenzieren; bei zwei 72^h Kulturen konnten nur 500 Zellen differenziert werden. Ausgezählt wurde vorwiegend die Fahne der Präparate, indem diese Gebiete mäanderförmig durch das Gesichtsfeld gezogen wurden. In jedem Gesichtsfeld wurden die Zellen differenziert und gezählt.

Es wurden folgende Zellen unterschieden: Proerythroblasten, basophile Erythroblasten, polychromatische Erythroblasten, oxyphile Erythroblasten, reife Erythroblasten, Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, eosinophile Myelozyten, basophile Myelozyten, Monoblasten, Jugendliche, Stabkernige, Segmentkernige, eosinophile Segmentkernige, basophile Segmentkernige, Monozyten. Lymphoblasten, Lymphozyten.

Große Reticulumzelle, kleine Reticulumzelle, phagocytierende Reticulumzelle, Plasmoblast, Plasmazelle.

Megakaryoblast, Megakaryocyt.

Als Unterscheidungsmerkmale galten folgende Kriterien (1):

Proerythroblast: Der Kern ist groß und rund. Sein dichtes Chromatinnetz ist feinkörnig strukturiert. Nucleoli sind nicht immer gut sichtbar. Das Protoplasma ist stark basophil und umgibt den Kern meist mit einem gleichmäßig schmalen Saum. Oft ist die Basophilie des Plasmas an einer Stelle in Kernnähe aufgehellt.

Basophiler Erythroblast: Gegenüber dem Proerythroblasten ist die Zelle kleiner und die Chromatinstruktur des Kerns gröber, der schon eine Radspeichenstruktur erkennen läßt. Das basophile Protoplasma umgibt den Kern nicht mehr so gleichmäßig breit, sondern ist oft zipfelig ausgezogen. Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Plasmas verschoben.

Polychromatischer Erythroblast: Hier hat der Kern meist eine Radspeichenstruktur. Je nach Reifegrad, also abhängig vom Hämoglobingehalt, ist die Farbe des Protoplasmas verschieden. Man findet Farben von grauviolett bis graurosa.

Oxyphiler Erythroblast: Die grobschollige Kernstruktur ist noch zu erkennen. Das Protoplasma ist wegen seines hohen Hämoglobingehalts nicht von dem der Erythrocyten zu unterscheiden.

Reifer Erythroblast: Der oft exzentrische Kern ist pyknotisch und läßt keine Struktur mehr erkennen. Das Protoplasma ist meist oxyphil, kann jedoch auch die graue Farbe des polychromatischen Erythroblasten zeigen. Sein für die Differenzierung entscheidendes Merkmal ist der pyknotische Kern.

Myeloblast: Der Kern hat in der Regel eine leicht ovale Form. Seine Chromatinstruktur ist sehr feinmaschig und dicht, wodurch ein leicht milchig-trübes Aussehen zustandekommt. 2-3 Nucleoli sind meist deutlich sichtbar. Das zart basophile Protoplasma findet sich oft nur an einer Seite des Kerns.

Promyelocyt: Der Kern ist von etwas gröberer Struktur als der des Myeloblasten. Auch er zeigt 1-2 Nucleoli. Der Protoplasmasaum ist reichlicher. In Kernnähe findet sich eine rötliche Aufhellung, und des öfteren sehen wir schon ein Protoplasma grau-blauer Tönung als Zeichen des Übergangs zum oxyphilen Protoplasma des Myelocyten. Immer weist der Promyelocyt eine, oft sehr dichte, grobe azurophile Granulation auf.

Neutrophiler Myelocyt; Der meist ovale oder auch nierenförmige Kern hat ein dichtes Chromatinnetz und keine Nucleoli. Das Protoplasma ist oxyphil, hat aber oft noch einen grau-blauen Ton. Die feinkörnige Granula sind neutrophil.

Eosinophiler Myelocyt: Er gleicht dem neutrophilen Myelocyten, nur sind hier die Granula grobschollig und eosinophil.

Basophiler Myelocyt: Plumpe basophile Granula bedecken Kern und Plasma dieses Myelocyten.

Monoblast: Rauchgraues Cytoplasma unterscheidet ihn von acidophilen Myelocyten.

Metamyelocyt: Der Metamyelocyt entspricht in seinem Äußeren bis auf den stärker eingebuchteten und etwas schollig strukturierten Kern dem Myelocyten.

Stabkerniger Granulocyt: Der Kern ist langgezogen und hufeisenförmig gebogen. Oft ist der Kern schon weitgehend pyknotisch. Das Protoplasma entspricht dem des Myelocyten.

Segmentkerniger Granulocyt: Der segmentkernige Granulocyt unterscheidet sich vom stabkernigern Granulocyten durch den meist in 4 Segmente unterteilten Kern. Die Segmente sind durch dünne Fäden miteinander verbunden. Mindestens besteht an einer Stelle ein Verdünnung des Kerns auf ein Drittel.

Eosinophiler segmentkerniger Granulocyt: Meist sind nur zwei, selten drei Segmente vorhanden; Eosinophile Granula breiten sich über die ganze Zelle aus.

Basophiler segmentkerniger Granulocyt: Die basophilen, groben Granula bedecken meist sehr dicht den zweisegmentierten Kern und das Plasma.

Monocyt: Sein heller Kern kann sich in verschiedenen Formen darbieten: eingebuchtet, gelappt oder stabförmig. Sein Chromatin zeigt eine zarte, lockere Struktur. Das Protoplasma ist rauchblau gefärbt und gelegentlich fein azurophil granuliert.

Lymphoblast: Der Lymphoblast ähnelt sehr dem Myeloblasten, unterscheidet sich aber von diesem durch eine weniger verwaschene Kernstruktur. In seinem Kern zeigen sich meist eine, bisweilen auch zwei Nucleolen. Sein Plasmasaum ist etwas breiter und hellblau, ohne Granula.

Lymphocyt: Der dunkle, rotviolette Kern des Lymphocyten ist rund, oval oder auch eingebuchtet. Er ist schollig strukturiert. Das hellblaue Protoplasma umgibt ihn mit schmalem Saum oft nicht vollständig und kann manchmal nur in sehr spärlichen Resten noch vorhanden sein. Es enthält nicht selten wenige feine azurophile Granula.

Große Reticulumzelle: Die in der Regel runden oder auch ovalen Kerne der Reticulumzellen sind locker netzig strukturiert und weisen meist 1-2 Nucleoli auf. Ihr Protoplasma ist von zartrosa oder hellblauer Farbe und nach außen oft so undeutlich abgegrenzt, daß die Größe der Zelle nicht zu bestimmen ist. Oft liegen die Kerne nackt da, weil sie beim Ausstreichen vom Plasma getrennt wurden.

Phagocytierende Reticulumzelle: Der Kern ähnelt dem der großen Reticulumzelle. Das Protoplasma ist hellblau und kann mannigfaltige Einschlüsse enthalten.

Plasmazellen: Die im Verhältnis zum Plasma kleinen runden Kerne liegen exzentrisch. Sie sind von grober, oft radspeichenartiger Struktur. Das reichliche Protoplasma ist stark RNS-haltig und stellt sich daher tief dunkelblau dar. Es kann jedoch bisweilen auch heller erscheinen. Fast regelmäßig ist es an einer Seite des Kernes aufgehellt. Häufig sind kleine Vakuolen vorhanden.

Megakaryoblast: Sein Kern ist groß und rund, Das Chromatin ist unscharf gezeichnet und zeigt deutlich mehrere Nucleolen. Das spärliche Protoplasma ist tief basophil und ohne Granula.

Megakaryocyt: Der Kern kann eine vielfältige, meist gelappte Form aufweisen. Das Chromatingerüst ist dicht und ungeordnet. Das amöboid vergrößerte Zellplasma ist violett und zeigt eine feine Granulation. Das Kern-Plasma-Verhältnis ist zugunsten des Plasmas verschoben.

Um die Beeinflussung der Mitosehäufigkeit festzustellen, wurden alle Zellteilungen, die in den ausgezählten Gesichtsfeldern entdeckt wurden, in ihren verschiedenen Phasen von uns registriert. Die Bestimmung der verschiedenen Mitosephasen wurden nach BOLL (14, 18) vorgenommen.

1.) Prophase: Die Kernmembran ist aufgelöst, die Kernsubstanz aufgelockert, es besteht noch ein festes Spirem, keine Nucleolen.

2.) Frühe Metaphase: Die nun gut sichtbaren Chromosomen sind über die früheren Kerngrenzen hinaus verteilt; das feste Spirem ist zum lockeren Spirem geworden.

3.) Späte Metaphase: Anordnung der Chromosomen zur Äquatorialplatte bzw. Monaster und deren Verdoppelung.

4.) Anaphase: Die zu den Spindelpolen auseinander weichenden Chromosomen bilden in der meist ovalen Zelle einen Diaster.

5.) Telophase: Die getrennten Chromosomen bilden ein lockeres Bi-Spirem. Das Protoplasma zeigt eine deutliche Einschnürung.

6.) Rekonstruktionsphase: Das Bi-Spirem hat sich gefestigt. Die fast getrennten beiden Zellen stehen nur über ein schmales Plasmafädchen oder garnicht miteinander in Verbindung. Die Zellen haben noch keine Kernmembran und keine Nucleolen gebildet.

Als teilungsfähig werden nach ROHR folgende Zellen angesehen:
Proerythroblast, basophiler Erythroblast, polychromatischer Erythroblast, oxyphiler Erythroblast.
Myeloblast, Promyelocyt, Myelocyt, Metamyelocyt.
Lymphoblast, große Reticulumzelle, Plasmoblast, Megakaryoblast.

Für die menschlichen Versuchsreihen wurden Kulturen von Sternalpunktaten neun verschiedener Patienten angelegt. Bei den Krankheiten handelte es sich fast immer um Anämien. Im einzelnen handelte es sich um folgende Patienten:

1. Patient: Martha St., Alter 66 J.

Klinische Diagnose: Hiatushernie
Blutungsanämie
Zustand nach Ovarektomie bds.

Sternalpunktion am 25.1.1967

Diagnose: rechtsverschobene gesteigerte Erythropoese mit fehlender Eisenspeicherung sprechen für Blutungsanämie.

Blutbild vom 24.1.

Ery	:	4.0 Mill/mm^3	Leuko	:	4300/mm^3
Hb	:	10,4 g%	Bas	:	1
Hb_E	:	26 yy	Eos	:	2
Reti	:	4 ‰	Stab	:	2
Thrombo	:	145 000/mm^3	Seg	:	70
			Lympho	:	17
			Mono	:	8

Eisen im Serum 85,2 y%

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

Doriden ^{R} 2 mal 1 Tbl.

Lanicor ^{R} 1 mal 1 Tbl.

Valium ^{R} 5 mg

2. Patient: Emma S., Alter 70 J.

Klinische Diagnose: Eisenmangelanämie bei okkulter Blutung aus Duodenaldivertikeln.

Sternalpunktion am 10.11.1967

Diagnose: angeregte Erythropoese wie bei Blutung oder bei Eisenmangel.
Anämie.

Blutbild vom 4.11.

Ery	: 2.33 Mill/mm^3	Leuko	: 4500/mm^3
Hb	: 4,6 g%	Eos	: 1
Hb_E	: 20 yy	Stab	: 2
Ani	: +	Segm	: 71
Poiki	: +	Lympho	: 23
Poly	: +	Mono	: 1
Reti	: 48 ‰	AMZ	: 2
		Fe	: 34 y%
		Thrombo	: 250 000/mm^3

Stuhl auf Sanguis positiv.

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

Ferlecit ^{R} 80 mg

Mixt.peps. 3 mal 2 Essl.-

Lanicor ^{R} 2 mal 1 Tbl.

Valium ^{R} 5 mg

3. Patient: Erika Z., Alter 44 J.

Klinische Diagnose: periphere Durchblutungsstörungen mit Gangrän
perniciöse Anämie

Sternalpunktion am 2.12.1968

Diagnose: fehlende Eisenspeicherung im Reticulum spricht für Infektanämie. Die hier vorliegende Anregung der Erythropoese ist sehr ungewöhnlich. Megaloblastenmark, Infektanämie.

Blutbild vom 6.12.

Ery	: 1,92 Mill/mm^3	Leuko	: 5000/mm^3
Hb	: 6,8 g%	Eos	: 3
Hb_E	: 35,7	Stab	: 1
Ani	: +++	Segm	: 61
Poiki	: +++	Lympho	: 29
Poly	: +++	Mono	: 1
Tox.gran.	: ++	AMZ	: 5
Reti	: 66 ‰		

Megaloblastoide Erythrocyten, Neutrophile zum Teil übersegmentiert, vereinzelt atypische Lymphocyten, 2 Riesenthrombocyten.

Folsre : 4,6 mmcg/ml

Rumpel - Leede positiv.

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

Cliradon R 1 mal 1 Tbl.	Atosil R 3 mal 25 gtt
Konakion R 3 mal 10 gtt	Dolantin R
Luminal f R	Baralgin R
	Terramycin R 1,5 g

4. Patient: Frieda J., Alter 67 J.

Klinische Diagnose: Lebercirrhose
Anämie
Arthritis urica
Waschmittelallergie

Sternalpunktion am 17.12.1968

Diagnose: Monocytär - reticuläre Reaktion bei etwas verminderter Granulopoese und Erythropoese
HepatogeneAnämie

Blutbild vom 16.12.

Ery	: 2,58 Mill/mm^3	Leuko	: 8300/mm^3
Hb	: 7,7 g%	Bas	: 2
Hb_E	: 32,2	Eos	: 12
Ani	: ++	Stab	: 3
Poiki	: +	Segm	: 58
Poly	: +	Lympho	: 22
Tox.gran.	: (+)	AMZ	: 3
Reti	: 95 ‰		

Blut erbrochen, Stuhl auf Sanguis positiv.

Osmotische Resistenz der Erythrocyten nach beiden Seiten verbreitert.

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

Atosil R	50 mg
Ultracorten R	50 mg
Zyloric R	3 mal 50 mg
Folsan R	2 mal 1 Amp
Ferlecit R	3 mal 30 gtt

5. Patient: Max K., Alter 74 J.

Klinische Diagnose: Oberschenkelfraktur re.
Anämie
Hepatopathie
Tumorverdacht

Sternalpunktion am 9.12.1968

Diagnose: die Anämie könnte auf Folsäuremangel beruhen. Auffällig ist die reticulär - monocytäre Reaktion. Die atypischen Riesenzellen können als secundäre Tumorzeichen gewertet werden.
Im Zusammenhang mit der Klinik: hepatogene Anämie.

Blutbild vom 5.12.

Ery	: 2,56 Mill/mm^3	Leuko	: 6000/mm^3
Hb	: 9,2 g%	Eos	: 3
Hb_E	: 36	Stab	: 5
Ani	: ++	Segm	: 72
Poiki	: +	Lympho	: 10
Poly	: ++	Nbl	: 2
Tox.gran.	: (+)	AMZ	: 8
Thrombo	: 197 000/mm^3	Folsre	: 5,7 mmcg/ml
Reti	: 27 ‰		

Einige megaloblastoide Erythrocyten, 3 basophil punktierte Erythrocyten, 2 Jolly-Körperchen, 2 zum Teil übersegmentierte Neutrophile.

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:
Lanicor ^{R} 2 mal 1 Tbl. Atosil ^{R} 50 mg
Andantol f ^{R} 3 mal 1 Tbl.

6, Patient: Frieda N., Alter 78 J.

Klinische Diagnose: schwere Herzrhythmusstörungen
Anämie unklarer Genese
Harnwegsinfekt

Sternalpunktion am 18.12.1968

Diagnose: bis auf leichte Reticulumzellvermehrung normal; kein Anhalt für Anämie außer Hypoplasie; im Zusammenhang mit der Klinik renale Anämie möglich.

Blutbild vom 13.12.

Ery	: 3,47 Mill/mm^3	Leuko	: 6300/mm^3
Hb	: 9,9 g%	Eos	: 4
Hb_E	: 28,7	Stab	: 2
Ani	: +	Segm	: 65
Poly	: +	Lympho	: 20
Tox.gran.	: (+)	Mono	: 2
Reti	: 6 ‰	AMZ	: 7
		Thrombo	: 268 000/mm^3

vereinzelt atypische Lymphocyten und übersegmentierte Neutrophile.

M.-Sonde frisches Blut

Stuhl auf Sanguis positiv.

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

Valium R	5 mg	1 Tbl./die.
Lanicor R		1 Tbl./die.
Nuran R	4 mg	2 Tbl./die.
Dosulfin R		1 Tbl./die.
Mixt.peps.		3 mal 1 Essl.
Ferlecit R		3 mal 30 gtt.

7. Patient: Pauline K., Alter 74 J.

Klinische Diagnose: Myocardinsuffizienz
perniciöse Anämie

Sternalpunktion am 3.11.1967

Diagnose: dekompens. perniciöse Anämie

Blutbild vom 1.11.

Ery	: 1,5 Mill/mm^3	Leuko	: 3400/mm^3
Hb	: 7,0 g%	Promy	: 3
Hb_E	: 46	Stab	: 2
Ani	: +++	Segm	: 50
Poiki	: ++	Lympho	: 40
Poly	: +++	Mono	: 1
Nbl	: 11	AMZ	: 4
Reti	: 43 ‰	Thrombo	: 128 000/mm^3

Megalocyten, Neutrophile zum Teil übersegmentiert, basophil punktierte Erythrocyten, 9 % polychromatische Erythroblasten.

Schilling - Test 1,47 %.

Price - Jones - Kurve: Basis erheblich verbreitert.

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:
angeblich schon mit B 12 vorbehandelt;

Lanicor R 3 mal 1 Tbl.

Mixt.peps. 3 mal 1 Essl.

Bepanthen R 2 mal 1 Amp.

8. Patient: Emma K., Alter 76 J.

Klinische Diagnose: BWS und LWS - Syndrom
Duodenaldivertikel
Sigmadivertikel
perniciöse Anämie
Malabsorption-Syndrom

Sternalpunktion am 29.5.1969

Diagnose: dekompens. perniciöse Anämie

Blutbild vom 24.5.

Ery	:	2,5 Mill/mm^3	Leuko	:	3700/mm^3
Hb	:	8,6 g%	Eos	:	4
Hb_E	:	34,4	Stab	:	1
Ani	:	++	Segm	:	58
Poiki	:	(+)	Lympho	:	33
Poly	:	(+)	Mono	:	4

Schilling-Test: keine Ausscheidung

Schilling-Test mit IF: Ausscheidung

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

Distraneurin ^{R}	
Lanicor ^{R}	2 mal 1 Tbl.
Valium ^{R}	10 mg
Novalgin ^{R}	3 mal 20 gtt

9. Patient: Bruno W., Alter 74 J.

Klinische Diagnose: Bronchopneunomie
Prostataadenom
Hypoplasie des Knochenmarks
bei hämorrhagischer Diathese

Sternalpunktion am 9.12.1968

Diagnose: es fällt gegenüber dem Vorpunktat die Ausreifung in der Erythropoese auf. Trotz Vitamin B 12 - Behandlung finden sich noch reichlich Megaloblastoide. Die Verminderung der Granulo- und Thrombopoese wird stärker. Panmyelopathie.

Blutbild vom 9.12.

Ery	: 2,52 Mill/mm^3	Leuko	: 2200/mm^3
Hb	: 8 g%	Meta	: 1
Hb_E	: 31,4	Stab	: 6
Ani	: ++	Segm	: 47
Poiki	: +	Lympho	: 30
Poly	: ++	Mono	: 4
Tox.gran.	: +	AMZ	: 12
Reti	: 45 ‰	Thrombo	: 7000/mm^3

Vereinzelt jugendliche atypische Lymphos.

Coombs-Test negativ

Osmot. Resistenz: Beginn der Hämolyse 0,54 %
totale Hämolyse 0,30 %

Therapie zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

Ultracorten R	25 mg	Cebion forte R	1g
Folsan R	3 mal 1 Amp.	Binotal R	500mg
BVK R	3 mal 1 Drag.		
Progynova R	2 mg		

Ergebnisse:

1) Ratten-Knochenmark.

Als Vorversuche wurden 4 Versuche mit Rattenknochenmark von ca. 8-10 Wochen alten Ratten ausgezählt.

Das Knochenmark wurde sofort nach der Tötung des Tieres aus dem Femurschaft gewonnen und nach oben angeführter Methode in der Flüssigkeitskultur kultiviert. Jeweils nach 24 h und 48 h wurden nach PAPPENHEIM gefärbte Ausstriche angefertigt und differenziert. Es wurden pro Präparat jeweils 1000 Zellen differenziert, insgesamt wurden 12 000 Zellen ausgezählt.

Es fand sich in den Originalausstrichen ungefähr die Zellverteilung, wie sie von HARRIS,C. und BURKE, W.T. für Ratten dieses Alters angegeben werden.

In der 24 h Kultur wurden Mitosen gesehen; die einzelnen Zelltypen zeigten nur geringe degenerative Veränderungen. Es fiel auf, daß die Zellen der Erythropoese vermindert waren. Die 48 h Kultur zeigte keine Mitosen. Es fanden sich jetzt bei allen Zelltypen starke Degenerationserscheinungen, die die Differenzierung erschwerten. Die Zellen der Erythropoese waren noch stärker vermindert.

In der folgenden Tabelle (Tab.1) werden die Mittelwerte im Differential-Myelogramm für 0 h, 24 h und 48 h angegeben, um die unterschiedliche Zellverteilung und die Entwicklung der Kultur zu veranschaulichen.

Die folgende Kurve (Abb.1) zeigt die prozentuale Verteilung der roten und weißen Zellen im Rattenknochenmark für 0 h, 24 h und 48 h, wobei die Gesamtzahl der roten wie auch der weißen Zellen gleich 100 % gesetzt wurden.

Tab. 1

	0h	24h	48h
Proerythroblast	0,2 %	0,2 %	0,0 %
basophiler Erythroblast	2,5 %	2,4 %	0,9 %
polychrom. Erythroblast	9,9 %	5,5 %	1,0 %
oxyphiler Erythroblast	0,1 %	0,0 %	0,0 %
reifer Erythroblast	7,7 %	2,2 %	0,5 %
Myeloblast	0,2 %	0,2 %	0,1 %
Promyelocyt	3,3 %	2,6 %	1,0 %
Myelocyt	13,6 %	11,3 %	6,7 %
eosinophiler Myelocyt	3,1 %	2,9 %	3,6 %
basophiler Myelocyt	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Monoblast	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Metamyelocyt	1,8 %	3,5 %	2,7 %
stabkerniger Granulocyt	11,5 %	13,1 %	12,0 %
segmentkern. Granulocyt	12,1 %	43,2 %	53,5 %
eosin. seg. Granulocyt	1,9 %	1,6 %	6,5 %
bas. seg. Granulocyt	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Monocyt	0,3 %	0,2 %	0,2 %
große Reticulumzelle	1,1 %	0,1 %	1,7 %
kleine Reticulumzelle	4,5 %	0,0 %	0,0 %
phagozyt,Reticulumzelle	2,4 %	0,0 %	0,2 %
Plasmablast	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Plasmazelle	0,8 %	0,3 %	0,1 %
Megakaryoblast	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Megakaryocyt	0,2 %	0,0 %	0,1 %
Lymphoblast	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Lymphocyt	23,0 %	9,0 %	4,9 %
Mastzellen	0,5 %	1,7 %	1,7 %
undifferenzierte Zellen	0,3 %	0,0 %	3,5 %
G / E I	2,4	13,4	29
r M I	45 %	55 %	0 %
w M I	19 %	7 %	0 %

Vorversuche Rattenknochenmark

Mittelwerte von 4 Versuchen

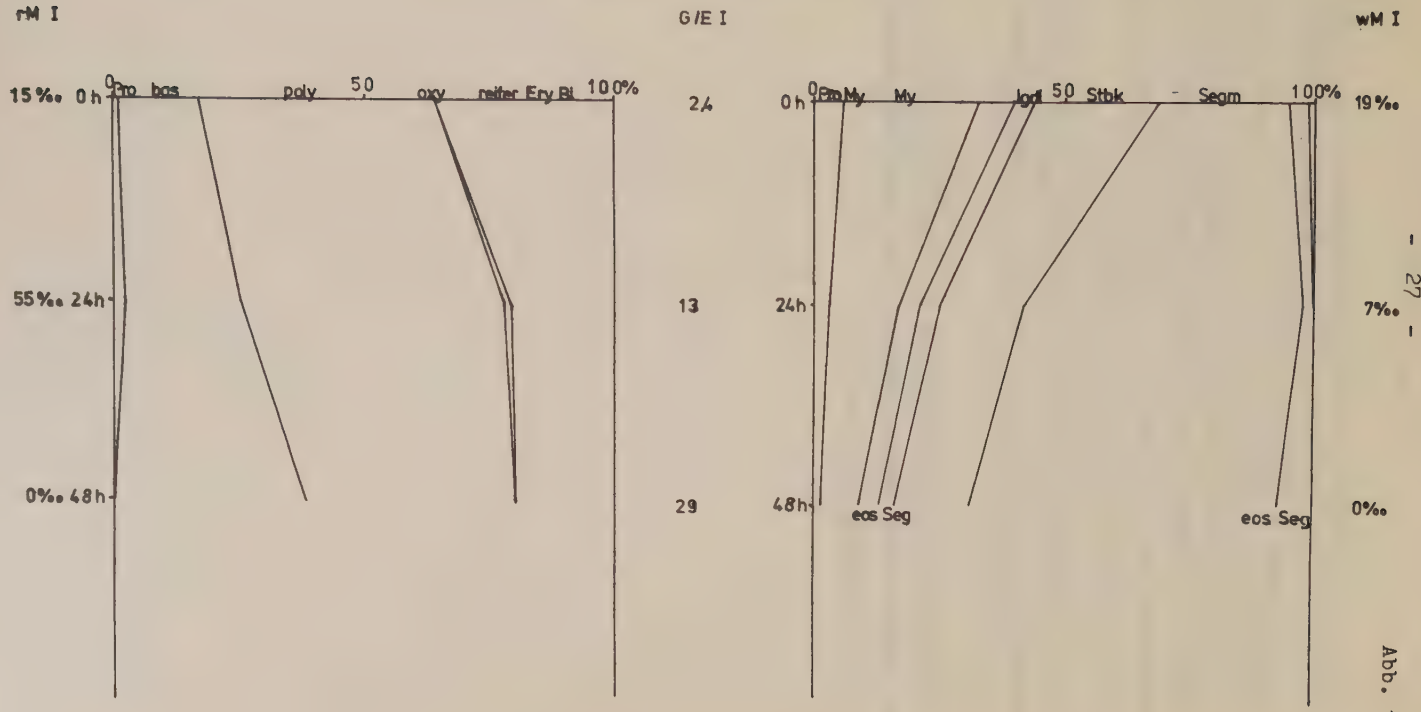


Abb. 1

Bei der Differenzierung der Kulturen fielen uns folgende morphologische Zellveränderungen auf:
In der Erythropoese traten bisweilen Formen mit einem pyknotischen gänseblümchenartig verformten Kern auf. Ihr Plasma war polychromatisch bis oxyphil. In der Größe entsprachen sie den polychromatischen bis reifen Erythroblasten.
In der Granulopoese fanden sich vereinzelt in der 48 h Kultur, häufiger in der 72 h Kultur, Degenerationserscheinungen in Form von Vakuolen.
Die geschilderten Veränderungen in der roten Reihe und die in der weißen Reihe traten sowohl bei der Koagulumkultur wie auch bei der Flüssigkeitskultur auf.

2.) Vergleich der Koagulumausstriche mit den Ausstrichen aus dem Sediment der Suspensionen bei Menschen.

Um die Frage nach einem Unterschied zwischen der Differentialverteilung im Originalausstrich eines Knochenmarkbröckchens und der Differentialverteilung nach dem Suspendieren zu beantworten, wurde folgende Kurve ausgelegt:

Abszisse : Zellen der roten und weißen Reihe

Ordinate : Abweichungen der Zellzahlen (absolute Werte) der Flüssigkeitskultur von denen der Koagulumkultur (Null-Linie).

Ausgezogene Linie : Mittelwerte der Abweichungen.

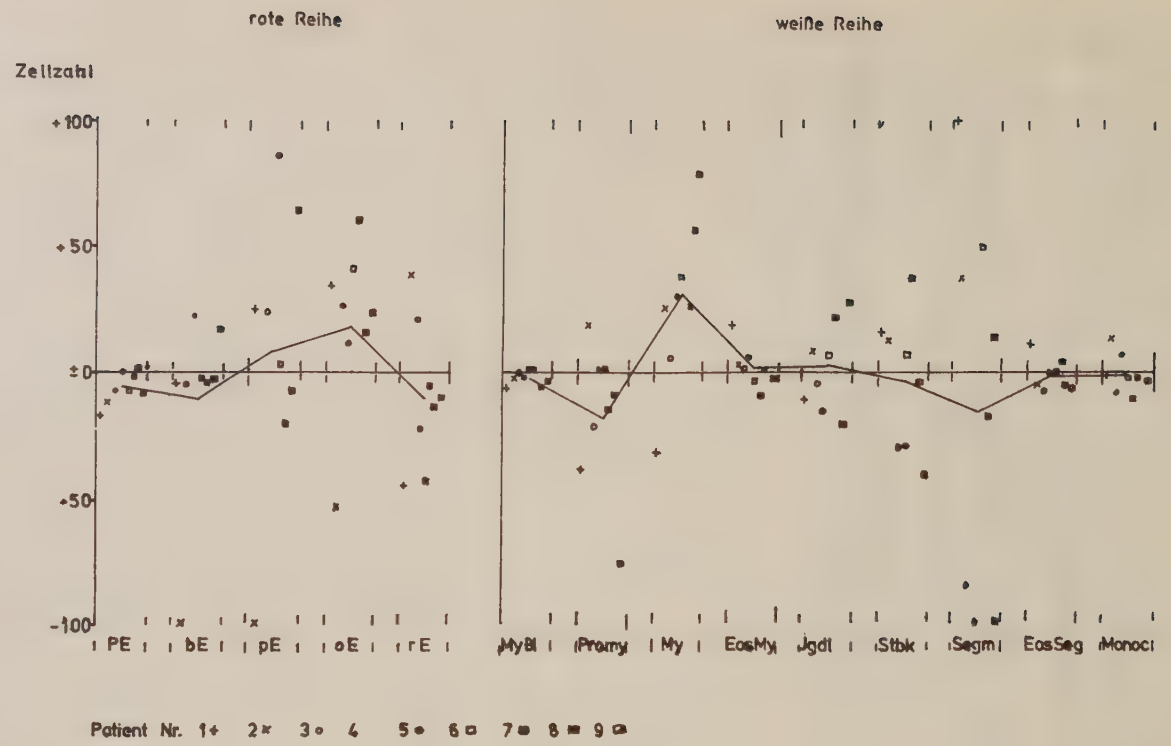

rote Reihe
weiße Reihe
Zellzahl
+100
+50
±0
-50
-100
PE
bE
pE
oE
rE
MyBl
Promy
My
EosMy
Jgdl
Stbk
Segm
EosSeg
Monoc
Patient Nr. 1+ 2× 3○ 4 5● 6□ 7■ 8▬ 9▭

Abb 2

Es kommen z.T. recht erhebliche Abweichungen zur Darstellung. In der roten Reihe finden sich die erheblichsten Schwankungen bei den polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten; in der weißen Reihe bei den Myelocyten und segmentkernigen Granulocyten. Die Unterschiede zeigen keine einheitliche Tendenz; es kommen positive und negative Abweichungen zur Darstellung, so daß die Mittelwerte, wenn auch nicht unerheblich, um die Null-Linie pendeln.

Berechnung der Signifikanz der Differenz der Zellzahlen in den Originalausstrichen gegenüber den Ausstrichen der Suspension für den polychromatischen Erythroblasten, oxyphilen Erythroblasten, Promyelocyt, Myelocyt und den segmentkernigen neutrophilen Granulocyt. (Studenttest)

polychromatischer Erythroblast

Original		Suspension	
x	x^2	x	x^2
1,66	2,75	1,91	3,64
3,16	9,98	2,16	4,66
1,53	2,34	1,77	3,13
1,04	1,08	1,90	3,61
3,61	13,03	3,64	13,24
2,87	8,23	2,66	7,07
1,32	1,74	1,24	1,53
0,65	0,42	1,29	1,66
15,84	39,57	16,57	38,54

$$x' = \frac{x}{N}$$

$$x_1' = \frac{15,84}{8} \qquad x_2' = \frac{16,57}{8}$$

$$x_1' = 1,98 \qquad x_2' = 2,07$$

$$s = \sqrt{\frac{x^2 - x \cdot x'}{N - 1}}$$

$$s_1 = \sqrt{\frac{39,57 - 1,98 \cdot 15,84}{7}} \qquad s_2 = \sqrt{\frac{38,54 - 2,07 \cdot 16,57}{7}}$$

$$s_1 = \sqrt{\frac{8,17}{7}} \qquad s_2 = \sqrt{\frac{4,34}{7}}$$

$$s_1 = \sqrt{1,17} \qquad s_2 = \sqrt{0,619}$$

$$s_1 = 1,081 \qquad s_2 = 0,786$$

polychromatischer Erythroblast

Original

$x'_1 = 1{,}98$

$s_1 = 1{,}081$

$N_1 = 8$

Suspension

$x'_2 = 2{,}07$

$s_2 = 0{,}786$

$N_2 = 8$

$$t = \frac{x'_1 - x'_2}{\sqrt{\frac{(N_1 - 1) \cdot s_1^2 + (N_2 - 1) \cdot s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

$$t = \frac{(1{,}98 - 2{,}07) \cdot \sqrt{\frac{64}{16}}}{\sqrt{\frac{7 \cdot 1{,}17 + 7 \cdot 0{,}619}{14}}}$$

$$t = \frac{0{,}09}{\sqrt{\frac{1{,}789}{8}}}$$

$$t = \frac{0{,}09}{\sqrt{0{,}223}}$$

$$t = \frac{0{,}09}{0{,}472}$$

$$t = 0{,}191$$

oxyphiler Erythroblast

Original	Suspension
$x'_1 = 0{,}29$	$x'_2 = 0{,}484$
$s_1 = 0{,}396$	$s_2 = 0{,}346$
$N_1 = 8$	$N_2 = 8$

$$t = \frac{(0{,}29 - 0{,}484) \cdot \sqrt{\frac{64}{16}}}{\sqrt{\frac{7 \cdot 0{,}157 + 7 \cdot 0{,}12}{14}}}$$

$$t = \frac{0{,}194}{\sqrt{\frac{0{,}277}{8}}}$$

$$t = \frac{0{,}194}{\sqrt{0{,}0346}}$$

$$t = \frac{0{,}194}{0{,}186}$$

$$t = 1{,}04$$

Promyelocyt

Original

$x'_1 = 0,43$

$s_1 = 0,419$

$N_1 = 8$

Suspension

$x'_2 = 0,26$

$s_2 = 0,126$

$N_2 = 8$

$$t = \frac{(0,43 - 0,26) \cdot \sqrt{\frac{64}{16}}}{\sqrt{\frac{7 \cdot 0,176 + 7 \cdot 0,016}{14}}}$$

$$t = \frac{0,17}{\sqrt{\frac{0,192}{8}}}$$

$$t = \frac{0,17}{\sqrt{0,024}}$$

$$t = \frac{0,17}{0,15}$$

$$t = 1,13$$

Myelocyt

Original	Suspension
$x'_1 = 1{,}04$	$x'_2 = 1{,}46$
$s_1 = 0{,}20$	$s_2 = 0{,}689$
$N_1 = 8$	$N_2 = 8$

$$t = \frac{(1{,}04 - 1{,}46) \cdot \sqrt{\frac{64}{16}}}{\sqrt{\frac{7 \cdot 0{,}476 + 7 \cdot 0{,}04}{14}}}$$

$$t = \frac{0{,}42}{\sqrt{\frac{0{,}516}{8}}}$$

$$t = \frac{0{,}42}{\sqrt{0{,}064}}$$

$$t = \frac{0{,}42}{0{,}252}$$

$$t = 1{,}66$$

segmentkerniger neutrophiler Granulocyt

Original	Suspension
$x'_1 = 1{,}68$	$x'_2 = 1{,}51$
$s_1 = 0{,}748$	$s_2 = 0{,}419$
$N_1 = 8$	$N_2 = 8$

$$t = \frac{(1{,}68 - 1{,}51) \cdot \sqrt{\frac{64}{16}}}{\sqrt{\frac{7 \cdot 0{,}56 + 7 \cdot 0{,}176}{14}}}$$

$$t = \frac{0{,}17}{\sqrt{\frac{0{,}736}{8}}}$$

$$t = \frac{0{,}17}{\sqrt{0{,}092}}$$

$$t = \frac{0{,}17}{0{,}303}$$

$$t = 0{,}56$$

Um signifikant zu sein, müßte t jeweils den Wert von 2,306 erreichen (P = 5 %).
Der Unterschied zwischen dem Originalausstrich und dem Ausstrich der Suspension ist also bei keiner Zellart signifikant.

Berechnung der Signifikanz des Unterschiedes der durchschnittli Mitoseindices der Erythropoese zwischen den Originalausstrichen und den Ausstrichen nach Suspendierung. (Studenttest)

N_1 = Zahl der teilungsfähigen Zellen in den Originalen

N_2 = Zahl der teilungsfähigen Zellen in der Suspension

$N = N_1 + N_2$

a_1 = Zahl der Mitosen in den Originalen

a_2 = Zahl der Mitosen in der Suspension

$a = a_1 + a_2$

$b_1 = N_1 - a_1$

$b_2 = N_2 - a_2$

Original	Suspension
$a_1 = 25{,}2$	$a_2 = 5{,}6$
$b_1 = 974{,}8$	$b_2 = 994{,}4$
$N_1 = 1000$	$N_2 = 1000$

$$t = \frac{(a_1 \cdot b_2 - a_2 \cdot b_1)}{\sqrt{\frac{a \cdot b \cdot N_1 \cdot N_2}{N}}}$$

$$t = \frac{(25{,}2 \cdot 994{,}4 - 5{,}6 \cdot 974{,}8)}{\sqrt{\frac{30{,}8 \cdot 1969{,}2 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$t = \frac{(25\,059 - 5\,459)}{\sqrt{\frac{60\,651 \cdot 1\,000}{2}}}$$

$$t = \frac{19\,600}{5\,500}$$

$$t = 3{,}56$$

Die Signifikanzschranke für t liegt bei 1,96 (p = 5 %). Der Unterschied der durchschnittlichen Mitoseindices der Erythropoese zwischen den Originalausstrichen und den Ausstrichen der Suspension ist also signifikant.

Berechnung der Signifikanz des Unterschiedes der durchschnittlichen Mitoseindices der Granulopoese zwischen d n Originalausstrichen und den Ausstrichen nach Suspendierung. (Studenttest)

N_1 = Zahl der teilungsfähigen Zellen in den Originalen

N_2 = Zahl der teilungsfähigen Zellen in der Suspension

$N = N_1 + N_2$

a_1 = Zahl der Mitosen in den Originalen

a_2 = Zahl der Mitosen in der Suspension

$a = a_1 + a_2$

$b_1 = N_1 - a_1$

$b_2 = N_2 - a_2$

Original	Suspension
$a_1 = 12{,}1$	$a_2 = 7$
$b_1 = 987{,}9$	$b_2 = 993$
$N_1 = 1000$	$N_2 = 1000$

$$t = \frac{(a_1 \cdot b_2 - a_2 \cdot b_1)}{\sqrt{\frac{a \cdot b \cdot N_1 \cdot N_2}{N}}}$$

$$t = \frac{(12{,}1 \cdot 993 - 7 \cdot 987{,}9)}{\sqrt{\frac{19{,}1 \cdot 1980{,}9 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$t = \frac{(12\,015{,}3 - 6\,915{,}3)}{\sqrt{\frac{37\,835{,}2 \cdot 1000}{2}}}$$

$$t = \frac{5\,100}{4\,350}$$

$$t = 1{,}17$$

Um signifikant zu sein, müßte t den Wert 1,96 erreichen (P = 5 %).

Der Unterschied der Mitoseindices der Granulopoese ist also nicht signifikant.

3) Vergleich der Suspensions- mit der Koagulum-Kultur.

Um die Frage nach einer Änderung der prozentualen Verteilung der Zellen in den Suspensionskulturen gegenüber den Koagulumkulturen zu beantworten, wurden für jede Zellart vier verschiedene Kurven angelegt.

Kurve I: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden.
Ordinate : Differentialzahlen in den Koagulumkulturen.

Kurve II: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden.
Ordinate : Differentialzahlen der Flüssigkeitskulturen.

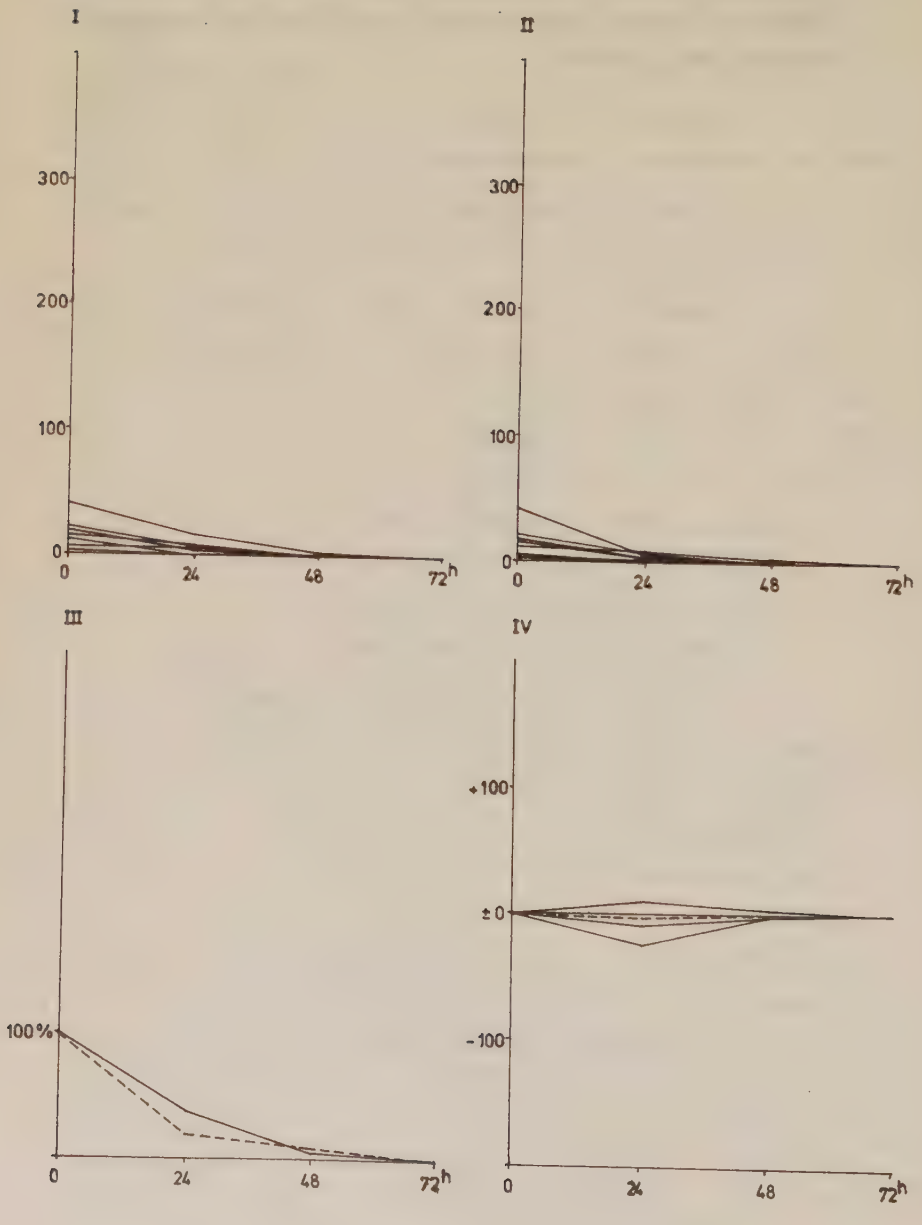
Kurve III: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden.
Ordinate : Mittelwerte der Zellzahlen aus allen Koagulumkulturen (ausgezogene Linie) und allen Flüssigkeitskulturen (gestrichelte Linie). Die durchschnittliche Zellzahl in den Originalausstrichen ist gleich 100 % gesetzt. Die durchschnittlichen Zellzahlen der Kulturen sind darauf umgerechnet in Prozent angegeben.

Kurve IV: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden.
Ordinate : Ausgezogene Linien : Abweichungen der Zellzahlen der neun Versuche (absolute Werte) in den einzelnen Flüssigkeitskulturen von denen in den Kontrollen (O-Linie).
Gestrichelte Linie : durchschnittliche Abweichung der Zellzahl aller Flüssigkeitskulturen von den Kontrollen.

Nicht dargestellt wurden die Verhältnisse bei den basophilen Myelocyten, Monoblasten, basophilen segmentkernigen Granulocyten, Monocyten, Lymphoblasten, Plasmoblasten, Plasmazellen, Megacaryoblasten, Megacaryocyten, weil diese Zellarten in zu geringer Zahl auftraten.

Proerythroblast

Abb 3



Proerythroblast.

Kurve I und II

Die zuerst unterschiedlichen Zellzahlen nehmen im Verlaufe der Kultivierungszeit ab und erreichen nach 48 h den O-Wert. Die Kurvenschar der Koagulumkultur verläuft etwa auf dem gleichen Niveau wie die Flüssigkeitskultur.

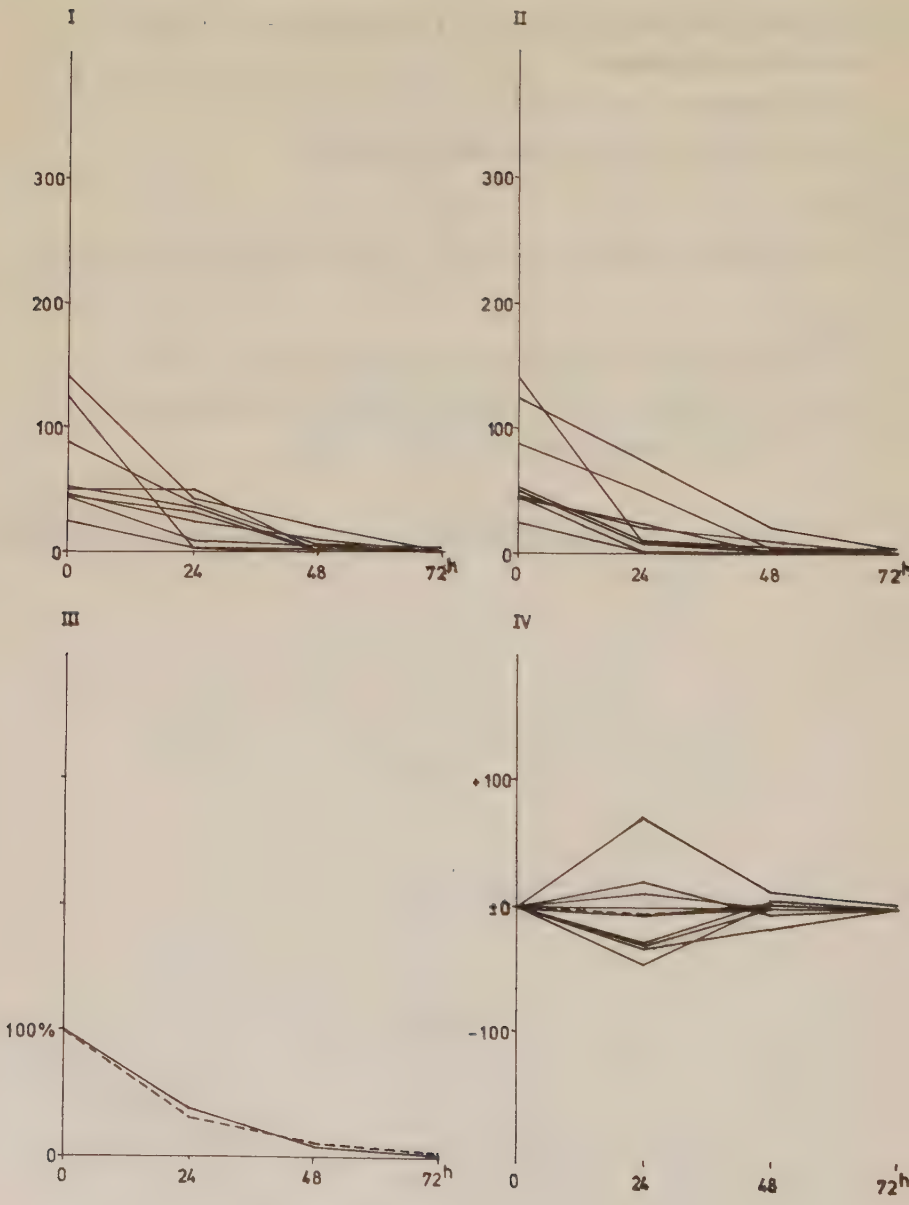
Kurve III

Die absinkenden Mittelwerts-Kurven verlaufen dicht nebeneinander.

Kurve IV

Die Abweichungen der Zellzahlen nach beiden Seiten sind nur minimal und halten sich die Waage, sodaß die Durchschnittskurve nur ganz gering von der O-Linie abweicht.

basophiler Erythroblast Abb 4



Basophiler Erythroblast.

Kurve I und II

Die zuerst sehr unterschiedlichen Zellzahlen nehmen im Verlauf der Kultivierungszeit ab und gleichen sich einander an. Die Kurven der Koagulumkulturen und der Flüssigkeitskulturen verlaufen etwa auf gleichem Niveau.

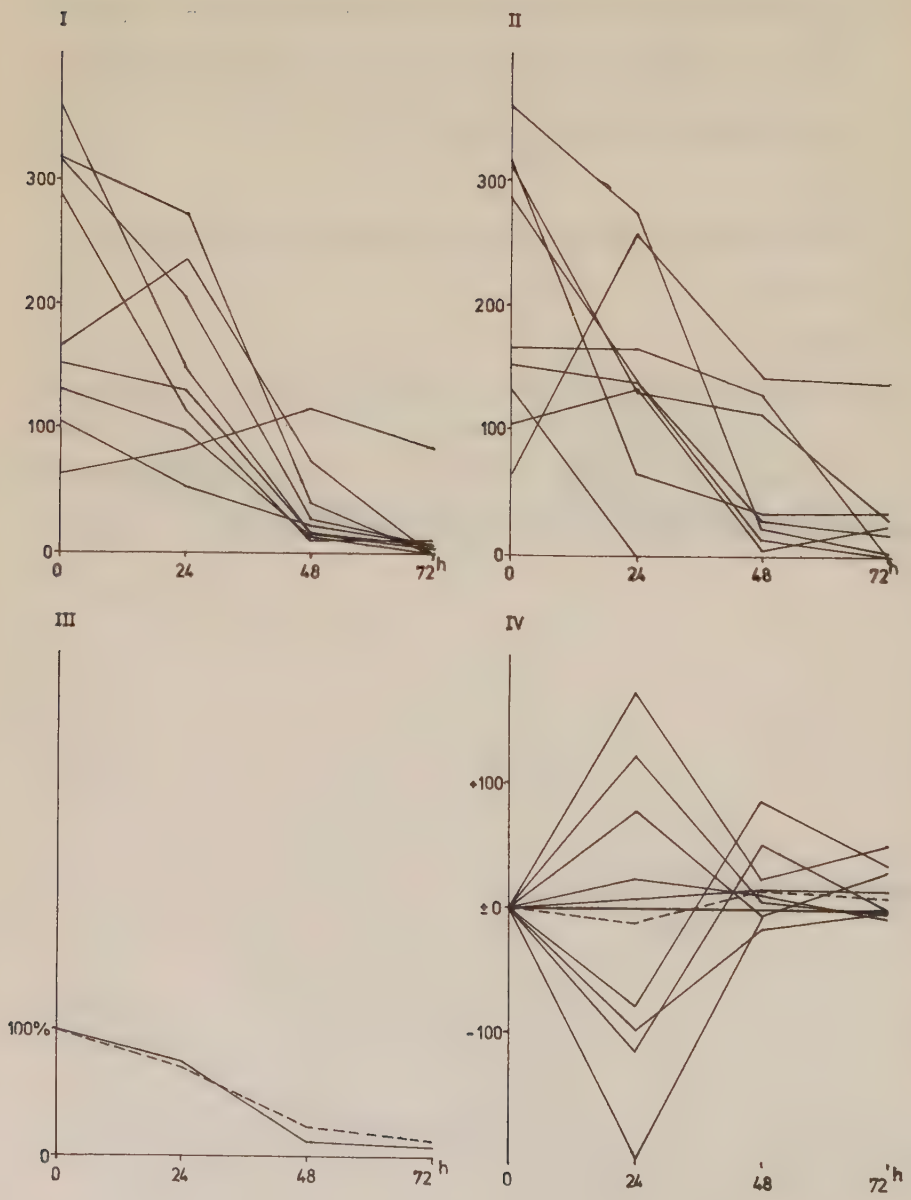
Kurve III

Die absinkenden Mittelwertskurven verlaufen sehr dicht nebeneinander.

Kurve IV

Die Abweichungen nach beiden Seiten sind nach 24 h am größten und nehmen im Laufe der Kultivierungszeit stark ab. Sie halten sich nach beiden Seiten die Waage, so daß die Durchschnittskurve nur unerheblich von der Null-Linie abweicht.

polychromatischer Erythroblast Abb 5



Polychromatischer Erythroblast.

Kurve I und II

Die sehr starken Schwankungen in der Zellzahl zu Beginn der Kultur werden mit zunehmender Kultivierungszeit immer ausgeglichener. Die Kurvenschar der Koagulumkultur wie der Flüssigkeitskultur verlaufen ungefähr auf gleicher Höhe.

Kurve III

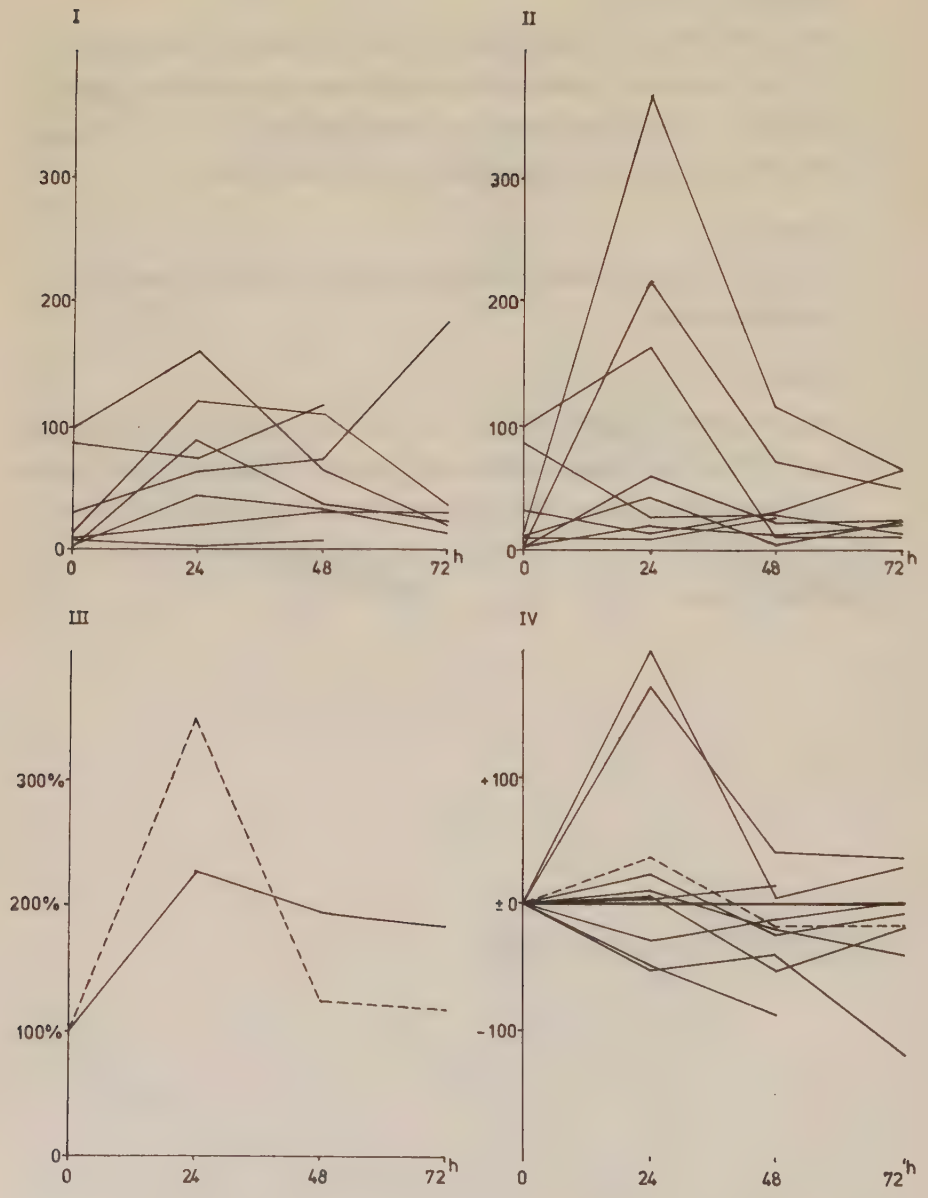
Die leicht absinkenden Mittelwertskurven verlaufen sehr dicht nebeneinander.

Kurve IV

Die durchschnittliche Abweichung der Zellzahl der Flüssigkeitskultur von der Koagulumkultur ist bei der großen Zellzahl nicht hoch. Es kommen aber besonders nach einer Kultivierungszeit von 24 h sehr starke Abweichungen vor, die sich aber ungefähr die Waage halten.

oxyphiler Erythroblast

Abb 6



Oxyphiler Erythroblast.

Kurve I und II

Die Kurven der Koagulumkultur zeigen nach einer Kultivierungszeit bis 24 h einen leichten Anstieg, um dann langsam abzufallen. Bei der Flüssigkeitskultur ist ein sehr starker Anstieg der Zellzahlen nach 24 h Kultivierungszeit zu verzeichnen. Danach kehren die Zellzahlen etwa auf die gleiche Ebene wie bei der Koagulumkultur zurück.

Kurve III

Die Durchschnittskurven der Relativwerte zeigen für die Flüssigkeitskultur nach einer Kultivierungszeit von 24 h einen sehr starken Anstieg gegenüber der Kurve der Koagulumkultur. Nach einer Kultivierungszeit von 48 h bzw. 72 h liegt die Kurve der Flüssigkeitskultur erheblich unter der der Koagulumkultur. Eine einheitliche Tendenz ist nicht festzustellen.

Kurve IV.

Die starken Unterschiede der absoluten Zellzahlen der Koagulumkultur zu denen der Flüssigkeitskultur ist hier deutlich sichtbar. Besonders fallen zwei starke Abweichungen nach oben auf. Gemessen an den starken Schwankungen erscheint die Abweichung der Durchschnittskurve von der Null-Linie nicht sehr erheblich.

Berechnung der Signifikanz der Differenz der Zellzahlen des oxyphilen Erythroblasten inden Ausstrichen der Koagulumkultur gegenüber den Ausstrichen der Flüssigkeitskultur nach einer Kultivierungszeit von 24^h und 48^h . (Studenttest)

Koagulumkultur	24^h	Flüssigkeitskultur
$x'_1 = 0{,}65$		$x'_2 = 1{,}02$
$s_1 = 0{,}519$		$s_2 = 1{,}23$
$N_1 = 9$		$N_2 = 9$

$$t = \frac{(0{,}65 - 1{,}02) \cdot \sqrt{\frac{81}{18}}}{\sqrt{\frac{8 \cdot 0{,}27 + 8 \cdot 1{,}51}{16}}}$$

$$t = \frac{0{,}37}{\sqrt{\frac{1{,}76}{9}}}$$

$$t = \frac{0{,}37}{\sqrt{0{,}195}}$$

$$t = \frac{0{,}37}{0{,}4415}$$

$$\underline{\underline{t = 0{,}84}}$$

Koagulumkultur 48h Flüssigkeitskultur

$x'_1 = 0{,}56$ $x'_2 = 0{,}36$

$s_1 = 0{,}378$ $s_2 = 0{,}352$

$N_1 = 9$ $N_2 = 9$

$$t = \frac{(0{,}56 - 0{,}36) \cdot \sqrt{\frac{81}{18}}}{\sqrt{\frac{8 \cdot 0{,}143 + 8 \cdot 0{,}124}{16}}}$$

$$t = \frac{0{,}20}{\sqrt{\frac{0{,}267}{9}}}$$

$$t = \frac{0{,}20}{\sqrt{0{,}0296}}$$

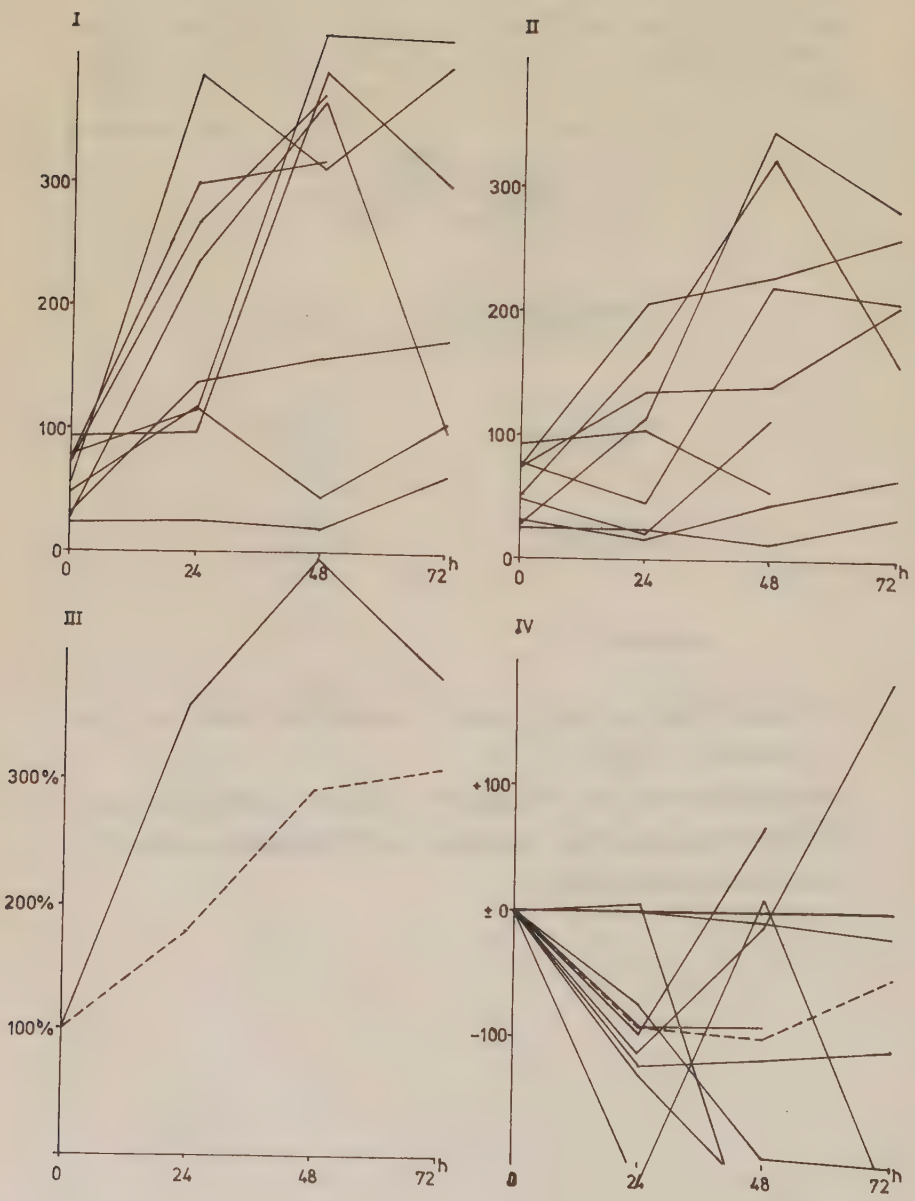
$$t = \frac{0{,}20}{0{,}172}$$

$$t = 1{,}16$$

Um signifikant zu sein , müßte t jeweils den Wert von 2,262 erreichen (P = 5%).

Der Unterschied der Zellzahl des oxyphilen Erythroblasten in der Koagulumkultur gegenüber der Flüssigkeitskultur ist also nicht signifikant.

reifer Erythroblast Abb 7



Reifer Erythroblast.

Kurve I und II

Die Differenzen zwischen den Anfangszahlen steigern sich im Laufe der Kultivierungszeit noch. Besonders bei der Koagulumkultur findet sich ein extrem starkes Ansteigen der Zellzahlen schon nach einer Kultivierungszeit von 24 h, die bis 48 h nur noch gering ansteigen, um dann etwas abzufallen. Bei der Flüssigkeitskultur zeigt sich ein etwa kontinuierliches Ansteigen der Zellzahlen über die Kultivierungszeit von 72 h, wobei die extremen Zellzahlen der Koagulumkultur nicht erreicht werden.

Kurve III

Die Durchschnittskurven der Relativwerte verdeutlichen diese Tendenz. Die Kurve der Koagulumkultur steigt bis zu einer Kultivierungszeit von 48 h stark an, um später abzufallen. Die Kurve der Flüssigkeitskultur zeigt ein stetiges Ansteigen. Nach einer Kultivierungszeit von 72 h nähern sich beide Kurven wieder.

Kurve IV

Die starken Schwankungen der absoluten Zellzahlen werden hier deutlich sichtbar. Es ist eine eindeutige Tendenz nach unten erkennbar. Die Durchschnittskurve der Abweichungen der Flüssigkeitskultur von der Koagulumkultur erreicht nach 48 h maximal den Wert von -100.

Berechnung der Signifikanz der Differenz der Zellzahlen des reifen Erythroblasten in den Ausstrichen der Koagulumkultur gegenüber den Ausstrichen der Flüssigkeitskultur nach einer Kultivierungszeit von 24^h und 48^h. (Studenttest)

Koagulumkultur 24^h Flüssigkeitskultur

$x'_1 = 1{,}87$ $x'_2 = 0{,}915$

$s_1 = 1{,}153$ $s_2 = 0{,}702$

$N_1 = 9$ $N_2 = 9$

$$t = \frac{(1{,}87 - 0{,}915) \cdot \sqrt{\frac{81}{18}}}{\sqrt{\frac{8 \cdot 1{,}33 + 8 \cdot 0{,}493}{16}}}$$

$$t = \frac{0{,}955}{\sqrt{\frac{1{,}823}{9}}}$$

$$t = \frac{0{,}955}{\sqrt{0{,}203}}$$

$$t = \frac{0{,}955}{0{,}450}$$

$$t = 2{,}13$$

Koagulumkultur 48^h Flüssigkeitskultur

$x'_1 = 2{,}64$ $x'_2 = 1{,}64$

$s_1 = 1{,}503$ $s_2 = 1{,}208$

$N_1 = 9$ $N_2 = 9$

$$t = \frac{(2{,}64 - 1{,}64) \cdot \sqrt{\frac{81}{18}}}{\sqrt{\frac{8 \cdot 2{,}26 + 8 \cdot 1{,}46}{16}}}$$

$$t = \frac{1{,}00}{\sqrt{\frac{3{,}72}{9}}}$$

$$t = \frac{1{,}00}{\sqrt{0{,}413}}$$

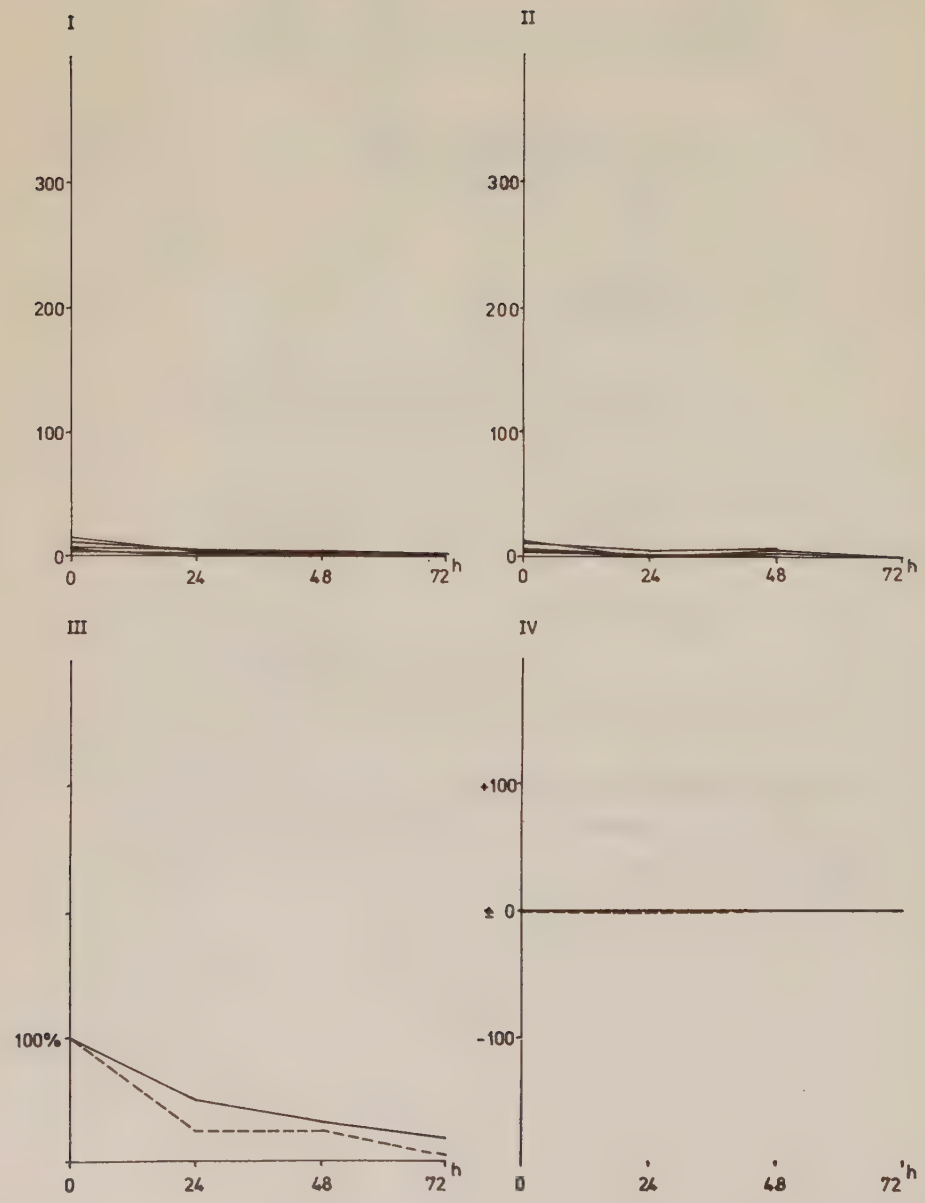
$$t = \frac{1{,}00}{0{,}6426}$$

$$t = 1{,}55$$

Um signifikant zu sein, müßte t jeweils den Wert von 2,262 erreichen (P = 5%).

Der Unterschied der Zellzahlen des reifen Erythroblasten in der Koagulumkultur gegenüber der Flüssigkeitskultur ist also nicht signifikant.

Myeloblast Abb 8



Myeloblast.

Kurve I und II

Die sehr niedrig verlaufenden Kurven liegen dicht beisammen; sie verlaufen auf dem gleichen Niveau.

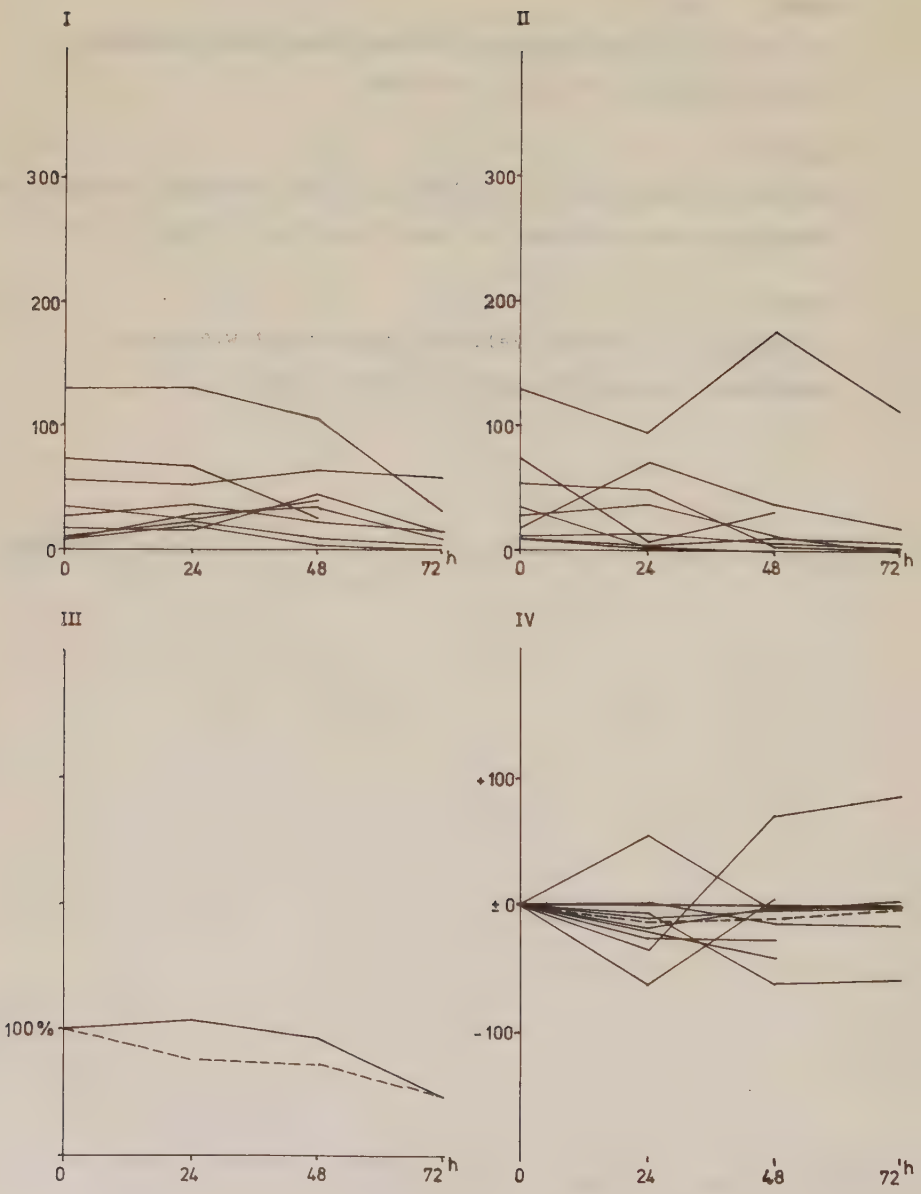
Kurve III

Die leicht abfallenden relativen Durchschnittskurven verlaufen gemessen an der niedrigen Zellzahl recht dicht nebeneinander.

Kurve IV

Auf Grund der niedrigen Zellzahl kommt so gut wie keine Abweichung von der Null-Linie zur Darstellung.

Promyelocyt Abb 9



Promyelocyt.

Kurve I und II

Die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Präparaten ist sehr unterschiedlich. Beide Kurvenscharen verlaufen etwa auf dem gleichen Niveau.

Kurve III

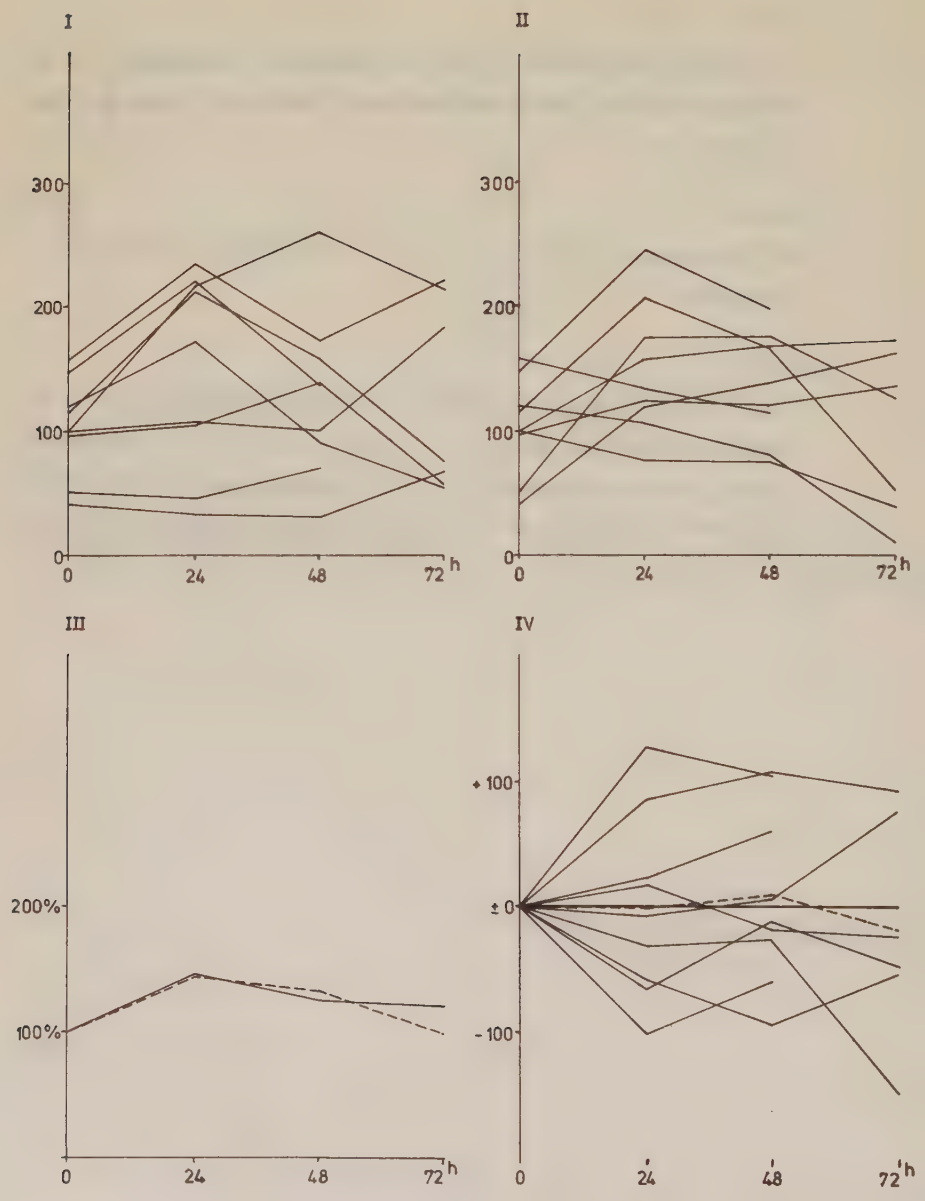
Die Durchschnittskurven verlaufen in geringem Abstand voneinander.

Kurve IV

Die Abweichung der Zellzahlen der Flüssigkeitskultur von der Koagulumkultur ist nicht unerheblich. Die Abweichungen nach beiden Richtungen kompensieren sich jedoch, so daß die Durchschnittskurve sich nur unerheblich unter die Null-Linie senkt.

Myelocyt

Abb 10



Myelocyt.

Kurve I und II

Die Präparate zeigen sehr unterschiedliche Zellzahlen bei der Koagulum- wie auch bei der Flüssigkeitskultur. Beide Kurvenscharen bewegen sich etwa auf gleicher Höhe.

Kurve III

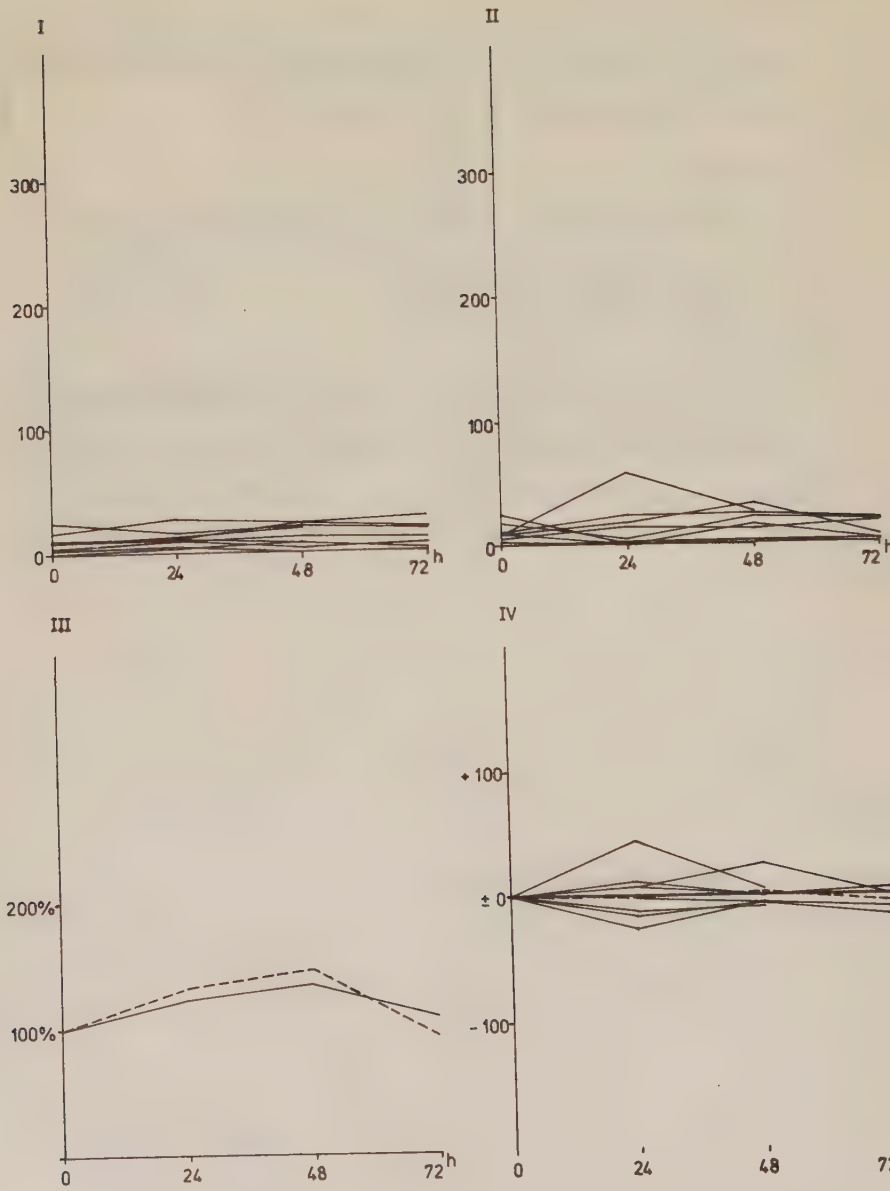
Die Durchschnittskurven entfernen sich fast gar nicht voneinander; lediglich nach einer Kultivierungszeit von 72 h ist eine nennenswerte Abweichung zu finden.

Kurve IV

Die Abweichungen der Zellzahlen der beiden Kulturmethoden sind groß. Sie werden jedoch dadurch ausgeglichen, daß die Schwankungen um die Null-Linie gleich sind. Die Durchschnittskurve der Abweichungen schmiegt sich sehr eng an die Null-Linie an.

Eosinophiler Myelocyt

Abb 11



Eosinophiler Myelocyt.

Kurve I und II

Die Zellzahlen liegen sehr dicht beieinander; auch verlaufen die Kurven beider Kulturmethoden dicht gebündelt auf einem Niveau. Lediglich ein Wert weicht bei der Flüssigkeitskultur nach 24 h ab.

Kurve III

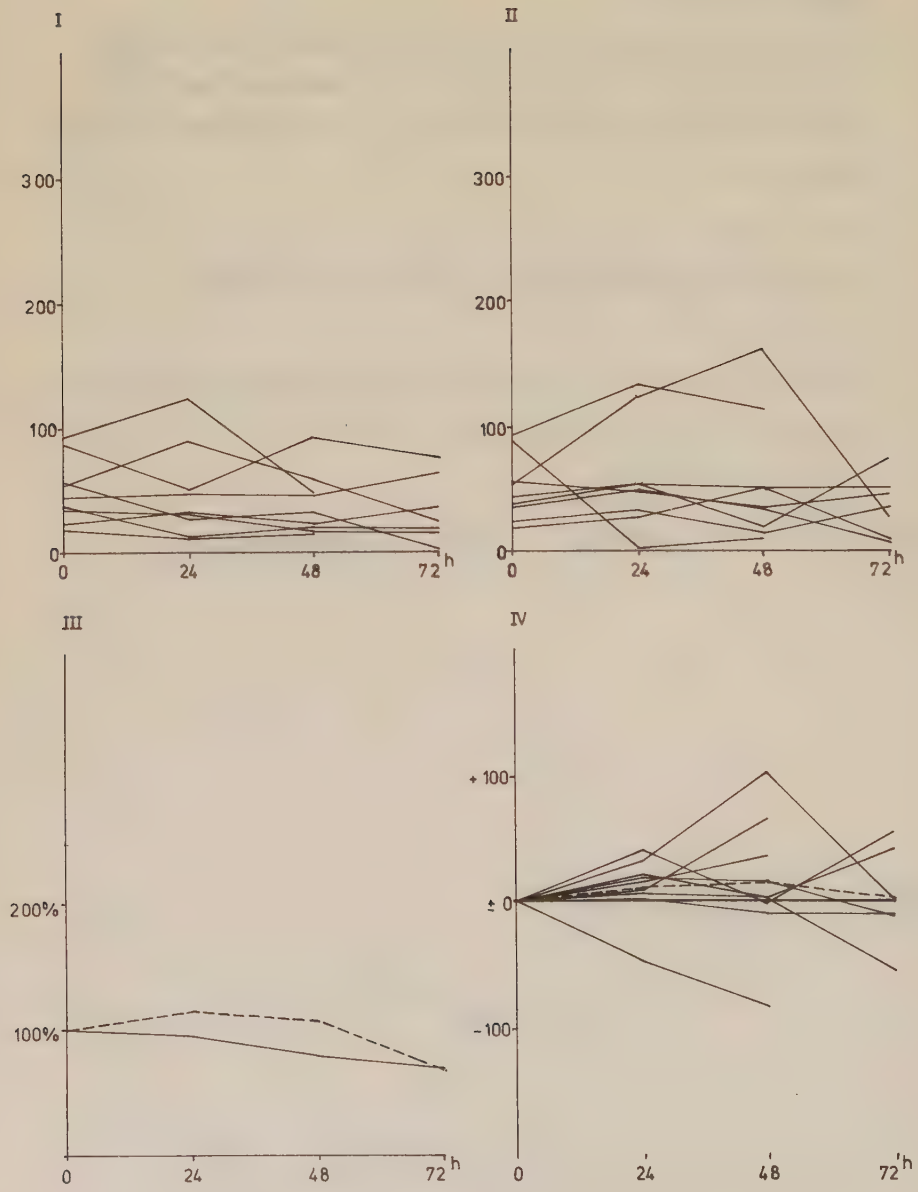
Beide Durchschnittskurven verlaufen eng beieinander.

Kurve IV

Die Abweichungen nach oben und nach unten halten sich völlig die Waage, so daß die Durchschnittskurve nur minimal von der Null-Linie abweicht.

Metamyelocyt

Abb 12



Metamyelocyt.

Kurve I und II

Die Kurven verlaufen in nicht allzu weiter Entfernung voneinander. Die Kurven der Koagulum- und der Flüssigkeitskultur verlaufen etwa auf der gleichen Höhe.

Kurve III

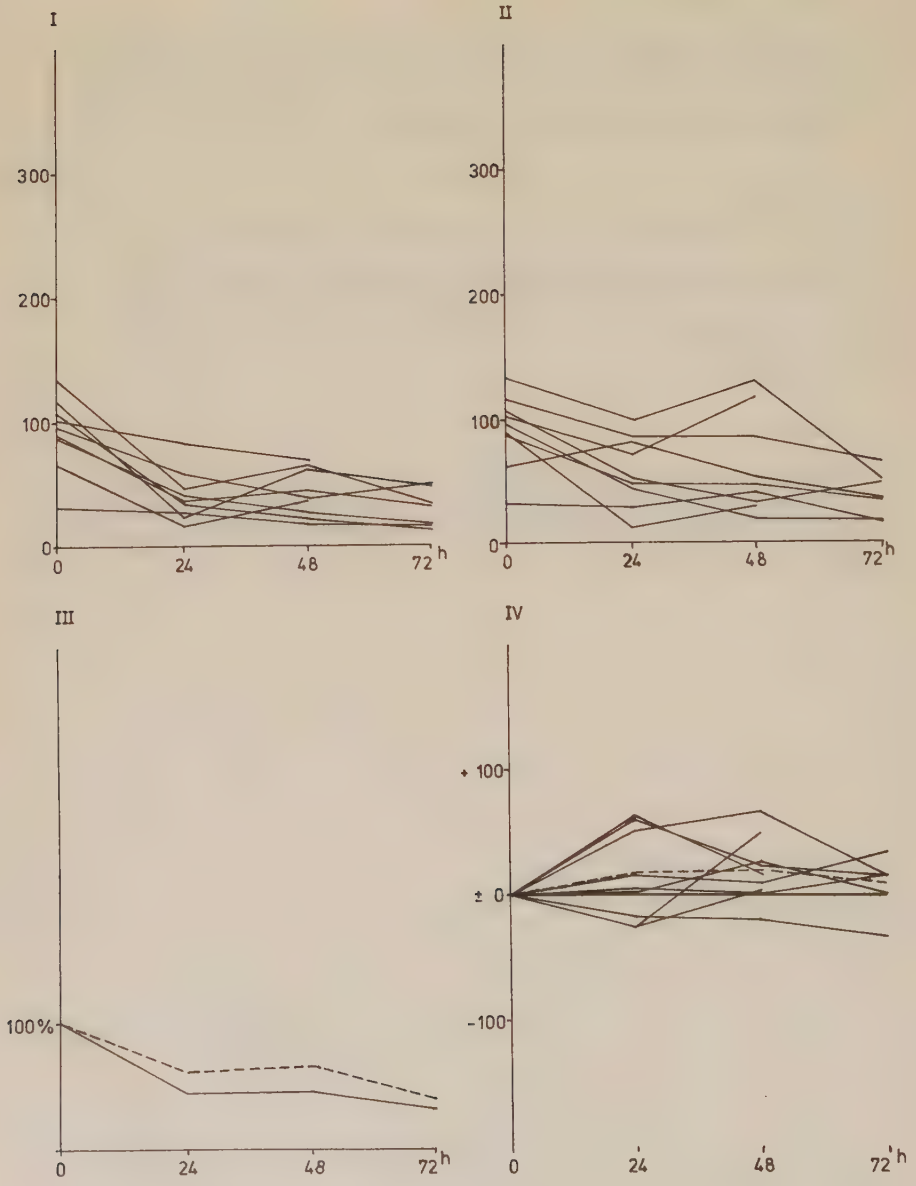
Die Durchschnittskurven verlaufen dicht beieinander. Die Durchschnittskurve der Flüssigkeitskultur verläuft über der der Koagulumkultur, um sich nach 72 h Kultivierungszeit zu treffen.

Kurve IV

Die Abweichungen nach oben und nach unten halten sich die Waage, so daß die Durchschnittskurve unerheblich über der Null-Linie liegt.

Stabkerniger Granulocyt

Abb 13



Stabkerniger Granulocyt.

Kurve I und II

Nach stärkeren Differenzen der Zellzahl zu Beginn der Kultur gehen die Zellzahlen der Koagulumkultur nach einer Kultivierungszeit von 24 h relativ dicht zusammen, um über die restliche Zeit weiterhin dicht beieinander zu verlaufen. Die Kurven der Flüssigkeitskultur behalten die anfängliche Differenz über die ganze Kulturzeit bei.

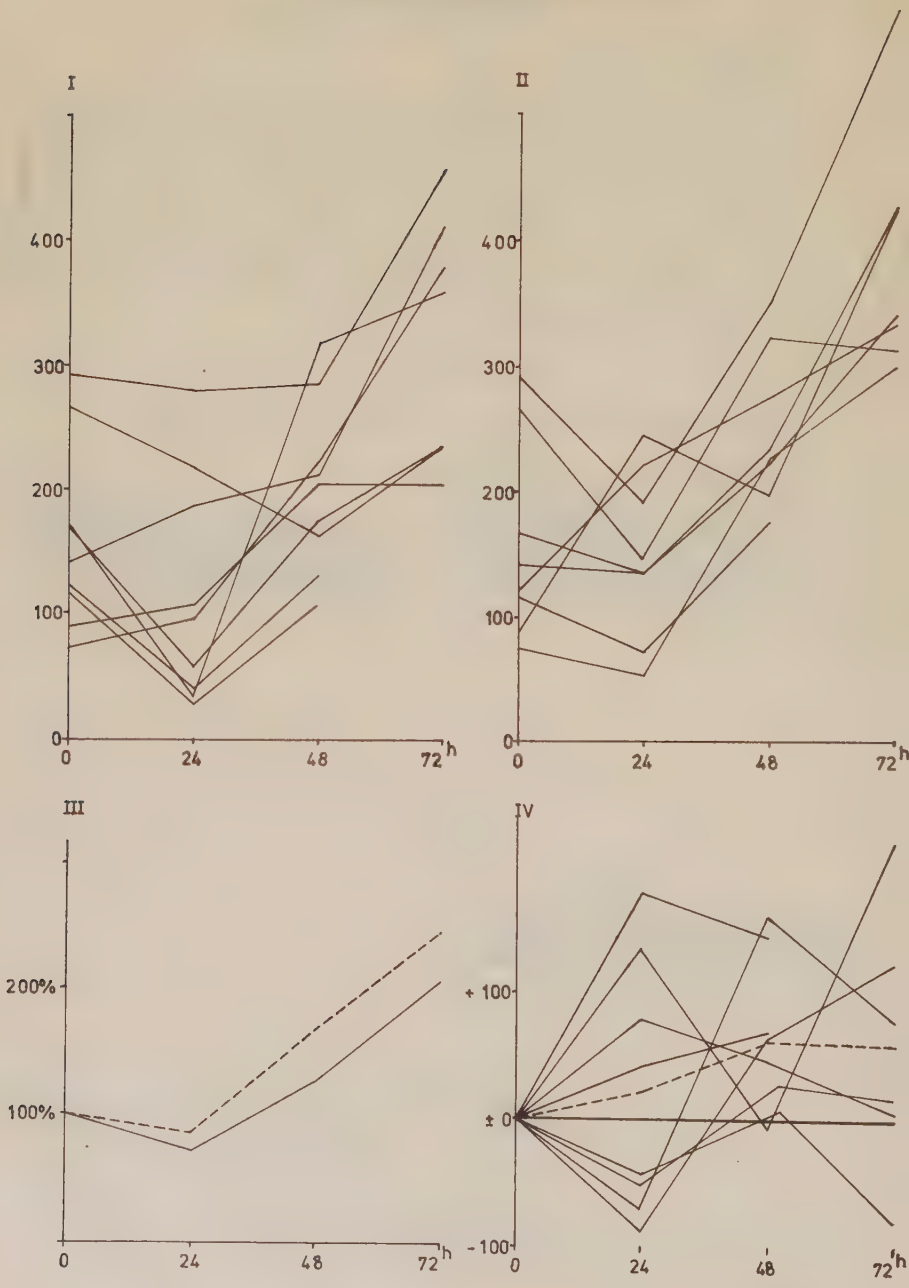
Kurve III

Die Mittelwertskurven verlaufen dicht beieinander.

Kurve IV

Die Abweichungen nach oben und unten sind ziemlich ausgeglichen, so daß die Durchschnittskurve nur gering von der Null-Linie abweicht.

Segmentkerniger neutrophiler Granulocyt Abb 14



Segmentkerniger neutrophiler Granulocyt.

Kurve I und II

Die am Anfang der Kultur sehr große Differenz der Zellzahlen ändert sich im Laufe der Kultivierungszeit nicht. Man findet ein stetiges Ansteigen der absoluten Zahlen nach einem initialen Abfall nach 24 h. Die Zellzahlen steigen bei der Flüssigkeitskultur viel stärker an als bei den Koagulumkulturen.

Kurve III

Die relativen Durchschnittskurven verlaufen parallel, die der Flüssigkeitskultur liegt gering über der der Koagulumkultur.

Kurve IV

Die Abweichungen gleichen sich nach 24 h Kultivierungszeit noch fast aus, um dann anzusteigen, so daß die Mittelwertskurve nach 24 h nur gering, nach 48 h und 72 h jedoch erheblich (+ 60) nach oben abweicht.

Berechnung der Signifikanz der Differenz der Zellzahlen des segmentkernigen neutrophilen Granulocyten in den Ausstrichen der Koagulumkultur gegenüber den Ausstrichen der Flüssigkeitskultur nach einer Kultivierungszeit von 48^h und 72^h.
(Studenttest)

Koagulumkultur 48^h Flüssigkeitskultur

$x'_1 = 2,03$ $x'_2 = 2,54$

$s_1 = 0,685$ $s_2 = 0,6099$

$N_1 = 9$ $N_2 = 8$

$$t = \frac{(2,03 - 2,54) \cdot \sqrt{\frac{72}{17}}}{\sqrt{\frac{8 \cdot 0,469 + 7 \cdot 0,372}{15}}}$$

$$t = \frac{0,51}{\sqrt{\frac{6,34}{64,5}}}$$

$$t = \frac{0,51}{\sqrt{0,098}}$$

$$t = \frac{0,51}{0,313}$$

$$t = 1,63$$

Koagulumkultur	72 h	Flüssigkeitskultur
$x'_1 = 3{,}26$		$x'_2 = 3{,}89$
$s_1 = 0{,}916$		$s_2 = 1{,}03$
$N_1 = 7$		$N_2 = 7$

$$t = \frac{(3{,}26 - 3{,}89) \cdot \sqrt{\frac{49}{14}}}{\sqrt{\frac{6 \cdot 0{,}84 + 6 \cdot 1{,}08}{12}}}$$

$$t = \frac{0{,}63}{\sqrt{\frac{1{,}92}{7}}}$$

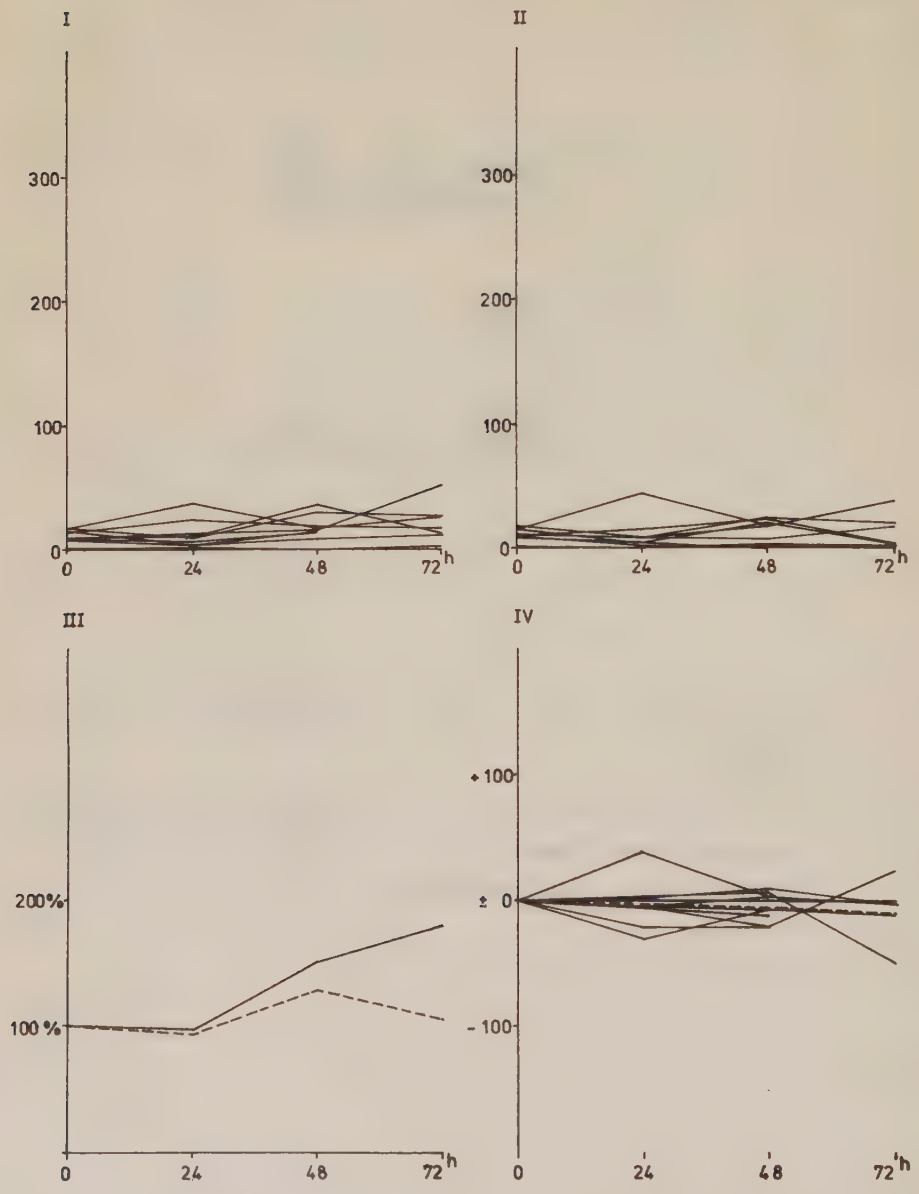
$$t = \frac{0{,}63}{\sqrt{0{,}274}}$$

$$t = \frac{0{,}63}{0{,}523}$$

$$t = 1{,}21$$

Um signifikant zu sein, müßte t jeweils den Wert von 2,262 erreichen (P = 5 %).
Der Unterschied der Zellzahl des segmentkernigen neutrophilen Granulocyten der Koagulumkultur gegenüber der Flüssigkeitskultur ist also nicht signifikant.

Segmentkerniger eosinophiler Granulocyt Abb 15



Segmentkerniger eosinophiler Granulocyt.

Kurve I und II

Die Kurven verlaufen dicht beieinander und auf gleicher Höhe.

Kurve III

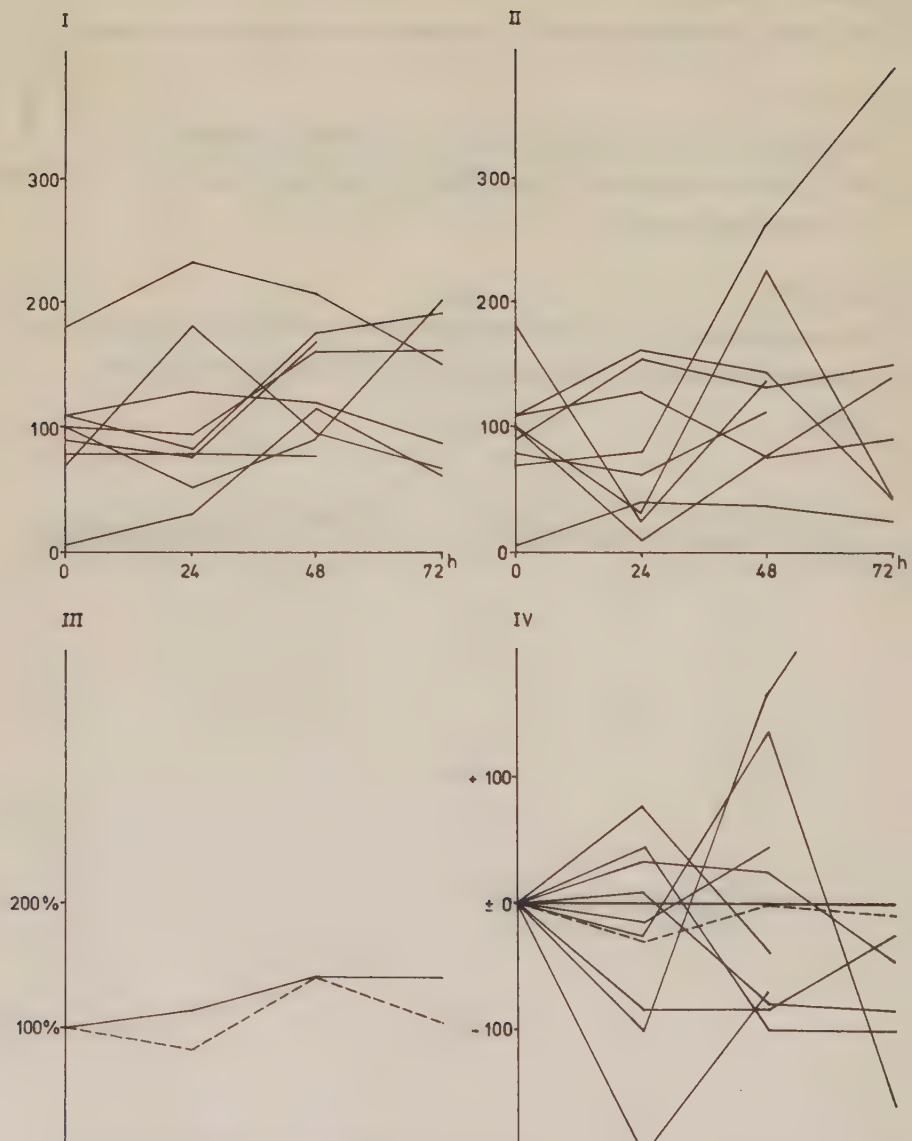
Die beiden Kurven verlaufen dicht beieinander, nur nach 72 h liegt die Kurve der Koagulumkultur deutlich über der der Flüssigkeitskultur.

Kurve IV

Die Abweichungen nach oben und nach unten gleichen sich völlig aus, so daß die Kurve der Mittelwerte minimal über der Null-Linie liegt.

Lymphocyt

Abb 16



Lymphocyt.

Kurve I und II

Die Anfangszahlen zeigen nicht unerhebliche Unterschiede, die sich im Laufe der Zeit nicht ausgleichen. Besonders bei der Flüssigkeitskultur zeigen sich nach 72 h sehr große Schwankungen.

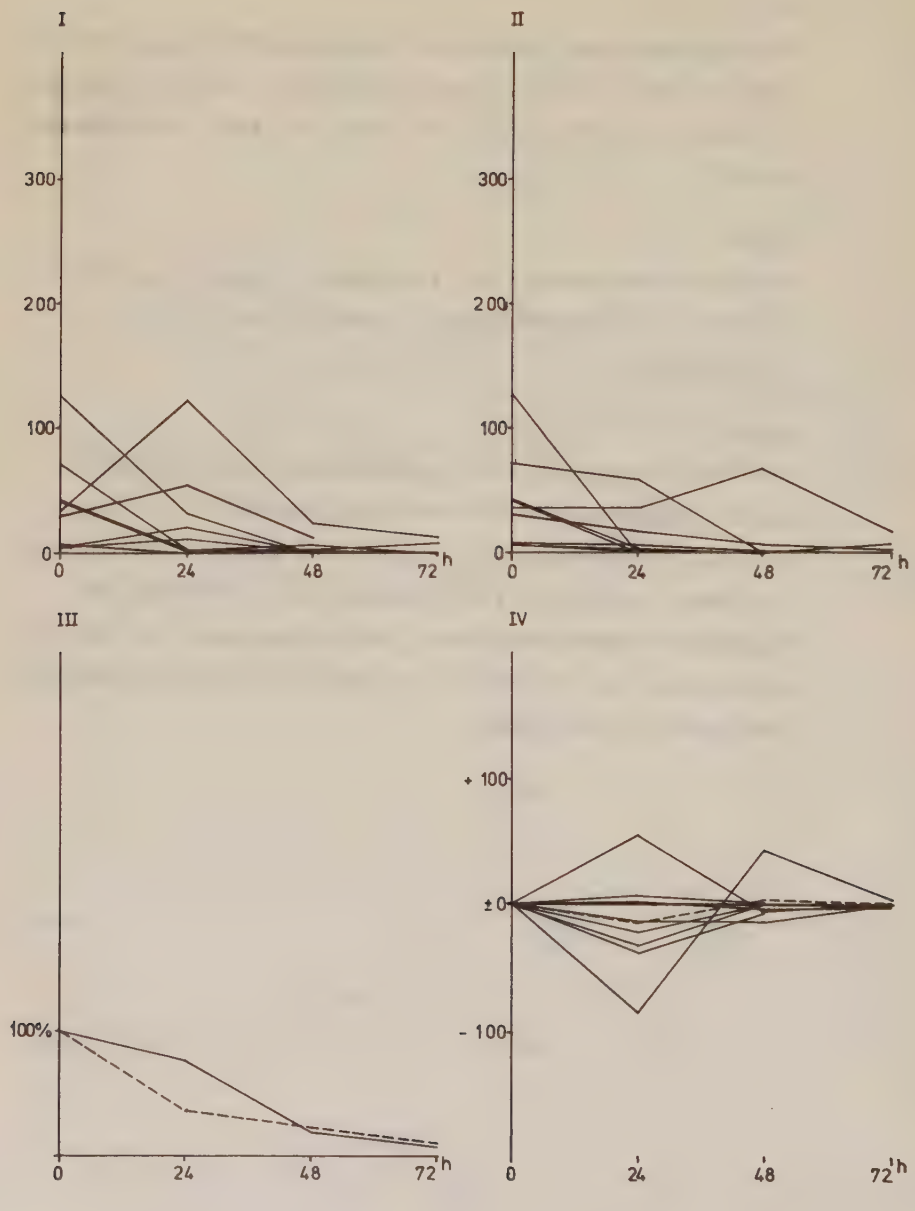
Kurve III

Die Durchschnittskurve der Flüssigkeitskultur liegt etwas unterhalb der Koagulumkultur, wobei der Wert für 48 h identisch ist.

Kurve IV

Die Abweichungen der Verteilungszahlen der Lymphocyten in der Flüssigkeitskultur von der Koagulumkultur sind groß, halten sich aber mit den positiven und negativen Werten fast die Waage, so daß nur eine etwas größere Abweichung der Durchschnittskurve nach einer Kultivierungszeit von 24 h zu verzeichnen ist. Im übrigen verläuft die Durchschnittskurve sehr nahe der Null-Linie.

Große -, kleine - und phagozytierende Retikulumzelle Abb 17



Große, kleine und phagocytierende Reticulumzelle.

Kurve I und II

Am Anfang der Kultur finden sich große Differenzen der Zellzahlen, die sich im Verlaufe der Kultivierungszeit angleichen. Beide Kurvenscharen verlaufen etwa auf dem gleichen Niveau.

Kurve III

Die Kurven der relativen Mittelwerte verlaufen dicht beieinander, divergieren nur nach einer Kultivierungszeit von 24 h etwas.

Kurve IV

Die Abweichungen nach oben und nach unten gleichen sich aus, so daß die Kurve der Mittelwerte nur ganz gering von der O - Linie abweicht.

Um festzustellen, ob sich Änderungen der G / E - Indices unter den verschiedenen Kulturbedingungen, der Koagulum- und der Flüssigkeitskultur ergeben, wurden folgende Kurven angelegt:

Kurve I: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : G / E - Indices der Koagulumkultur.

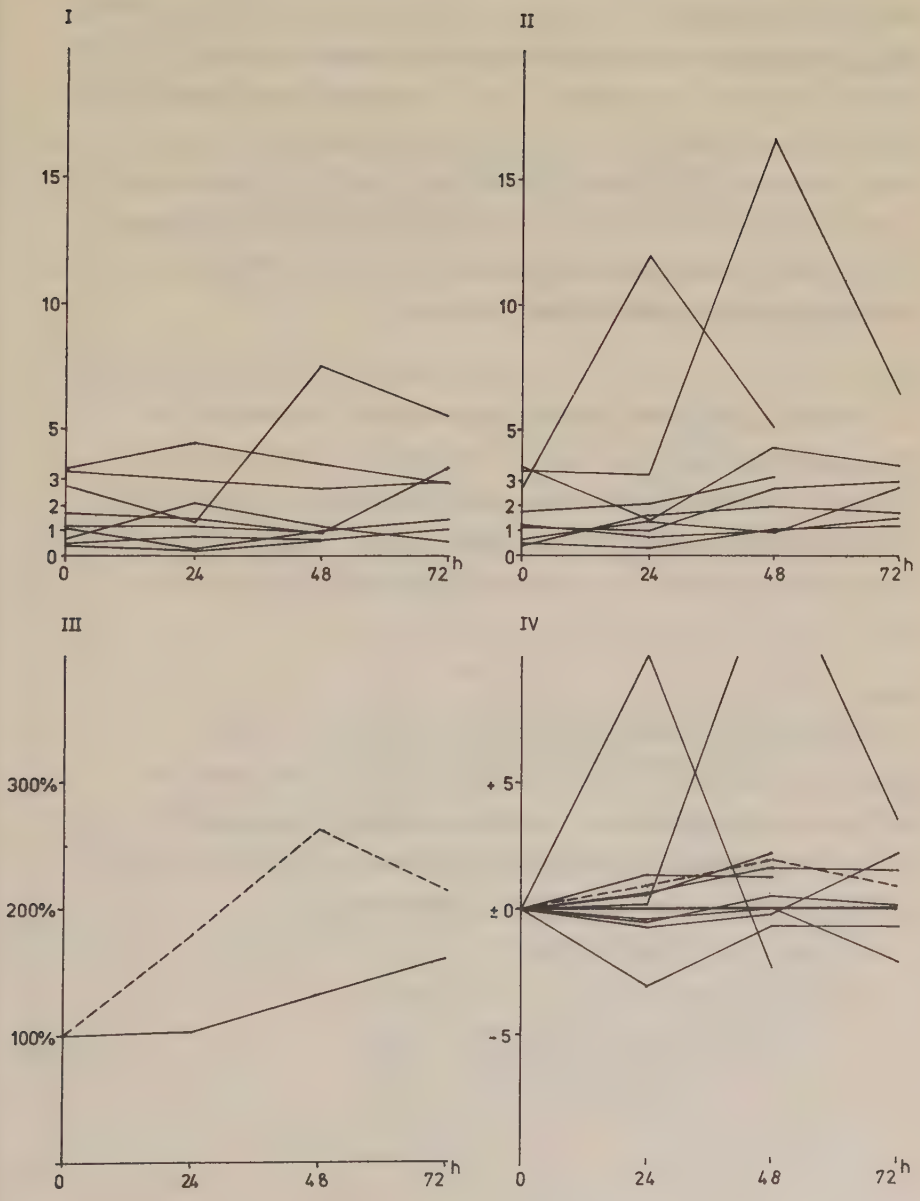
Kurve II: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : G / E - Indices der Flüssigkeitskultur.

Kurve III: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : Ausgezogene Linie : Mittelwerte der G / E - Indices aus allen Koagulumkulturen.
Gestrichelte Linie : Mittelwerte der G / E - Indices aus allen Flüssigkeitskulturen.
Die Mittelwerte der G / E - Indices in den Originalen wurden gleich 100 % gesetzt, und die durchschnittlichen G / E - Indices darauf umgerechnet in Prozent ausgedrückt.

Kurve IV: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : Abweichungen der G / E - Indices der Flüssigkeitskulturen von den G / E - Indices der Koagulumkultur (O - Linie).
Gestrichelte Linie : Mittelwerte der Abweichung der G / E - Indices aller Flüssigkeitskulturen von den G / E - Indices der Koagulumkulturen.

G/E Index

Abb 18



G / E - Index.

Kurve I und II

Die Differenzen der G / E - Indices am Anfang der Kultur bleiben auch über die gesamte Kultivierungszeit bestehen. Bei der Koagulumkultur findet sich nur eine Kurve, die sich über das Niveau der anderen erhebt. Bei der Flüssigkeitskultur finden sich zwei Kurven mit extrem hohen Werten. Mit Ausnahme der extremen Kurven verlaufen die Kurvenscharen der beiden Kulturmethoden in einer Ebene.

Kurve III

Die Kurve der relativen Mittelwerte der G / E - Indices der Flüssigkeitskultur erhebt sich weit über die Kurve der Koagulumkultur. Dieses Ergebnis ist durch die beiden extremen Werte bei der Flüssigkeitskultur zustandegekommen. Eliminiert man diese beiden Extreme, so verlaufen beide Kurven dicht beieinander.

Kurve IV

Die Abweichungen nach oben und nach unten halten sich die Waage, mit Ausnahme von zwei extremen Werten. Die Kurve der mittleren Abweichung liegt erheblich oberhalt der O - Linie. Werden die Extremwerte eliminiert, so verläuft die Kurve der mittleren Abweichung ganz dicht an der O - Linie.

Um die Frage nach einem Unterschied der Mitosehäufigkeit in der Koagulumkultur gegenüber der Flüssigkeitskultur zu beantworten, wurden für den roten und weißen Mitoseindex (Zahl der Mitosen bezogen auf 1000 teilungsfähige Zellen) folgende Kurven angelegt:

Kurve I: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : Mitoseindex der Koagulumkultur.

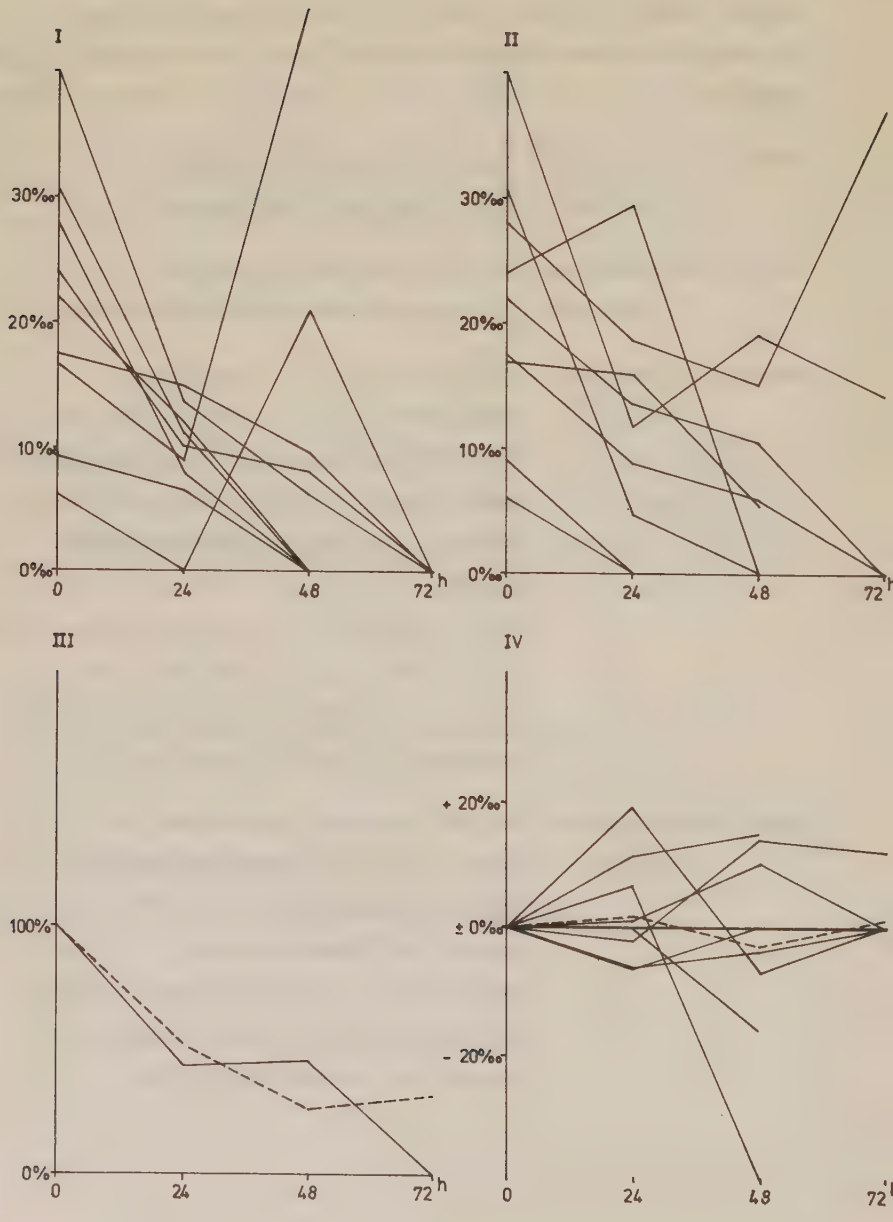
Kurve II: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : Mitoseindex der Flüssigkeitskultur.

Kurve III: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : Ausgezogene Linie : Mittelwerte der Mitoseindices aus allen Koagulumkulturen.
Gestrichelte Linie : Mittelwerte der Mitoseindices aus allen Flüssigkeitskulturen.
Die Mittelwerte der Originale wurden gleich 100 % gesetzt und die durchschnittlichen Mitoseindices darauf umgerechnet in Prozent ausgedrückt.

Kurve IV: Abszisse : Kultivierungszeit in Stunden
Ordinate : Abweichungen der Mitoseindices der Flüssigkeitskultur von der Mitoseindices der Koagulumkultur (0 - Linie).
Gestrichelte Linie: Mittlere Abweichung aller Mitoseindices der Flüssigkeitskultur von der Koagulumkultur.

roter Mitoseindex

Abb 19



Roter Mitoseindex.

Kurve I und II

Die Mitoseindices sind am Anfang der Kulturen sehr unterschiedlich hoch. Sie nehmen im Verlaufe der Kultur ab und nähern sich gegen Null. Bei der Koagulumkultur finden sich zwei Kurven, die stark von der allgemeinen Kurvenschar abweichen. Bei der Flüssigkeitskultur finden sich auch im Laufe der Kulturzeit sehr starke Schwankungen. Beide Kurvenscharen zeigen eine fallende Tendenz und laufen etwa auf gleichem Niveau.

Kurve III

Beide Kurven verlaufen eng beieinander.

Kurve IV

Die Abweichungen der Mitoseindices nach oben und nach unten sind recht erheblich, gleichen sich aber aus, so daß die Kurve der Mittelwerte nur gering um die Null-Linie schwankt.

Berechnung der Signifikanz des Unterschiedes der durchschnitt-lichen Mitoseindices der Erythropoese zwischen der Koagulum-kultur und der Flüssigkeitskultur nach einer Kultivierungszeit von 24^h und 48^h. (Studenttest)

Koagulumkultur 24^h Flüssigkeitskultur

$a_1 = 9,5$ $a_2 = 11,4$

$b_1 = 990,5$ $b_2 = 988,6$

$N_1 = 1000$ $N_2 = 1000$

$$t = \frac{(9,5 \cdot 988,6 - 11,4 \cdot 990,5)}{\sqrt{\frac{20,9 \cdot 1971,1 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$t = \frac{9391,7 - 11291,7}{\sqrt{41195,99 \cdot 500}}$$

$$t = \frac{1900}{4527}$$

$$t = 0,42$$

Koagulumkultur 48^h Flüssigkeitskultur

$a_1 = 10,1$ $a_2 = 6,4$

$b_1 = 989,9$ $b_2 = 993,6$

$N_1 = 1000$ $N_2 = 1000$

$$t = \frac{10,1 \cdot 993,6 - 6,4 \cdot 989,9}{\sqrt{\frac{16,5 \cdot 1983,5 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$t = \frac{3700}{\sqrt{16859,75 \cdot 1000}}$$

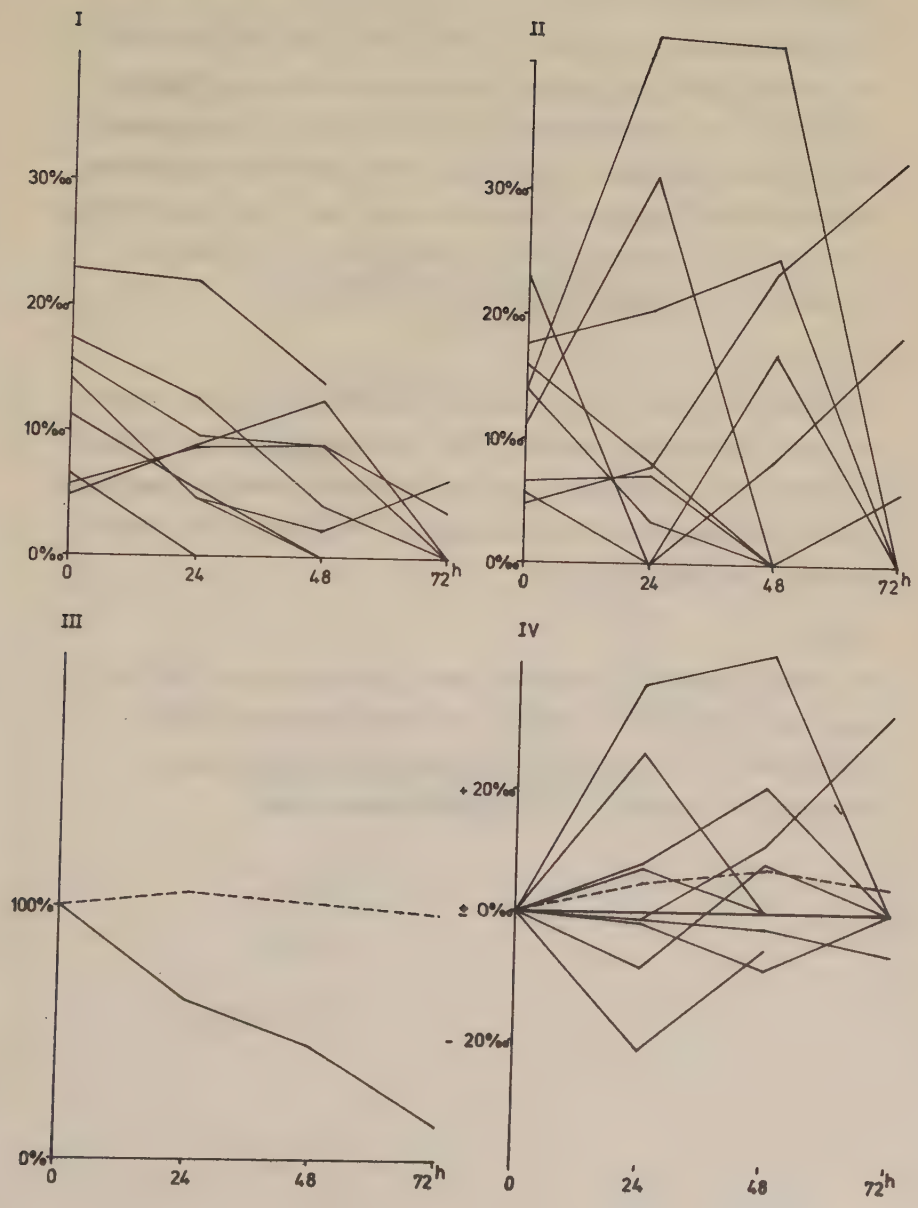
$$t = \frac{3700}{4098}$$

$$t = 0,90$$

Um signifikant zu sein, müßte t den Wert 196 erreichen (P = 5%). Der Unterschied der Mitoseindices ist also nicht signifikant.

weißer Mitoseindex

Abb 28



Weißer Mitoseindex.

Kurve I und II

Die Mitoseindices der Koagulumkultur schwanken im Laufe der Kulturzeit erheblich, zeigen jedoch eine eindeutige Tendenz gegen Null. Bei der Flüssigkeitskultur sind die Schwankungen der Mitoseindices erheblich größer. Eine einheitliche Tendenz der Kurvenschar ist nicht festzustellen. Das Niveau der Kurvenschar bei der Flüssigkeitskultur liegt über dem Niveau der Kurvenschar der Koagulumkultur.

Kurve III

Die Kurve der relativen Mittelwerte der Koagulumkultur zeigt im Laufe der Kultivierungszeit eine eindeutig fallende Tendenz. Die Kurve für die Mitoseindices der Flüssigkeitskultur verläuft während der gesamten Kultivierungszeit dicht ober- und unterhalb des Ausgangswertes.

Kurve IV

Die Schwankungen nach oben und unten sind erheblich. Es ist aber eine einheitliche Tendenz der Abweichung nach oben zu beobachten, die in der Kurve der Mittelwerte mit einer Abweichung bis maximal + 7,1 ‰ zum Ausdruck kommt.

Berechnung der Signifikanz des Unterschiedes der durchschnittlichen Mitoseindices der Granulopoese zwischen der Koagulumkultur und der Flüssigkeitskultur nach einer Kultivierungszeit von 24^h , 48^h und 72^h. (Studenttest)

Koagulumkultur 24^h Flüssigkeitskultur

$a_1 = 8,5$ $a_2 = 13,3$

$b_1 = 991,5$ $b_2 = 986,7$

$N_1 = 1000$ $N_2 = 1000$

$$t = \frac{8,5 \cdot 986,7 - 13,3 \cdot 991,5}{\sqrt{\frac{21,8 \cdot 1978,3 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$t = \frac{4800}{\sqrt{21562,38 \cdot 1000}}$$

$$t = \frac{4800}{4636}$$

$$t = 1,039$$

Koagulumkultur 48^h Flüssigkeitskultur

$a_1 = 5,7$ $a_2 = 12,8$

$b_1 = 994,3$ $b_2 = 987,2$

$N_1 = 1000$ $N_2 = 1000$

$$t = \frac{5,7 \cdot 987,2 - 12,8 \cdot 994,3}{\sqrt{\frac{18,5 \cdot 1981,5 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$t = \frac{7130}{\sqrt{18328,87 \cdot 1000}}$$

$$t = \frac{7130}{4277}$$

$$t = 1,67$$

Koagulumkultur 72^h Flüssigkeitskultur

$a_1 = 1{,}44$ $a_2 = 7{,}8$

$b_1 = 998{,}56$ $b_2 = 992{,}2$

$N_1 = 1000$ $N_2 = 1000$

$$t = \frac{1{,}44 \cdot 992{,}2 - 7{,}8 \cdot 998{,}56}{\sqrt{\frac{9{,}24 \cdot 1990{,}76 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$t = \frac{6460}{\sqrt{9173{,}8 \cdot 1000}}$$

$$t = \frac{6460}{9576}$$

$$t = 0{,}675$$

Um signifikant zu sein , müßte t den Wert 1,96 erreichen (P = 5%).

Der Unterschied der Mitoseindices ist also nicht signifikant.

Um die Frage nach einer unterschiedlichen Mitosephasenverteilung bei den verschiedenen Kulturtechniken zu beantworten, wurde die graphische Darstellung in einer karyologischen Kurve gewählt.

Ausgezogene Linie : Prozentuale Verteilung der Mitosephasen in den Koagulumkulturen.

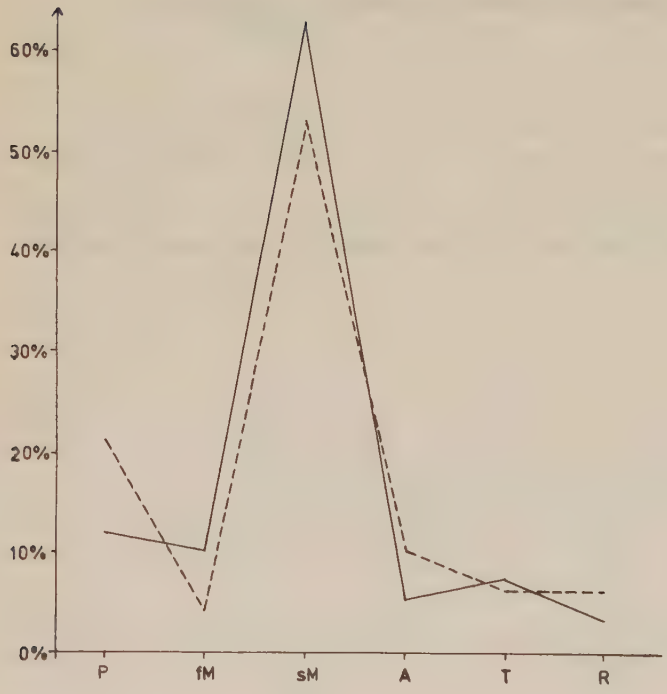
Gestrichelte Linie: Prozentuale Verteilung der Mitosephasen in den Suspensionskulturen.

Es findet sich praktisch keine Änderung der Mitosephasenverteilung.

Abb 21

Karyologische Kurve

—— Kontrolle : 59 Mitosen
--- Suspension : 102 Mitosen



Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Ratten-Knochenmark.

   In der 24 h Kultur wurden Mitosen gesehen; die einzelnen Zelltypen zeigten nur geringe degenerative Veränderungen. Es fiel auf, daß die Zellen der Erythropoese vermindert waren. Die 48 h Kultur zeigte keine Mitose. Es fanden sich jetzt bei allen Zelltypen starke Degenerationserscheinungen, die die Differenzierung erschwerten. Die Zellen der Erythropoese waren noch stärker vermindert.

2. Nach dem Homogenisieren des Knochenmarks findet sich im Vergleich zum Originalausstrich kein Unterschied der prozentualen Verteilung der Zellen.

   Es konnte aber nach Suspendierung des Knochenmarks eine Abnahme der Mitosehäufigkeit besonders bei der Erythropoese festgestellt werden.

3. Im Verlauf der Kultivierungszeit treten morphologische Veränderungen auf.

   In der Erythropoese treten bisweilen Formen mit einem pyknotischen, gänseblümchenartig verformten Kern auf. Ihr Plasma ist polychromatisch bis oxyphil. In der Größe entsprechen sie den polychromatischen bis reifen Erythroblasten.

   In der Granulopoese finden sich vereinzelt in der 48 h Kultur, häufiger in der 72 h Kultur, Degenerationserscheinungen in Form von Vakuolen.

   Es findet sich aber kein Unterschied zwischen der Koagulum- und der Flüssigkeitskultur.

4. Es findet sich kein Unterschied der prozentualen Verteilung der Zellen in der Koagulumkultur gegenüber der Flüssigkeits-

kultur. Lediglich die reifen Erythroblasten sind in der Flüssigkeitskultur gegenüber der Koagulumkultur in der Zellzahl erheblich vermindert (Abb.7). Dieses Ergebnis muß diskutiert werden.

5. Ein Unterschied in der Mitosehäufigkeit der Erythropoese und in der Mitosephasenverteilung läßt sich nicht feststellen. Hingegen bleibt der mittlere Mitoseindex der Granuloblasten in der Flüssigkeitskultur im Gegensatz zur Koagulumkultur praktisch die ganzen 72 h auf dem Ausgangswert. Eine Signifikanz ließ sich jedoch für dieses Ergebnis nicht feststellen.

Diskussion.

Folgende Fragen wurden gestellt:

1.) Findet sich nach dem Homogenisieren des Knochenmarks, wie es für die Flüssigkeitskultur erforderlich ist, ein Unterschied in der prozentualen Verteilung der Zellen und in der Mitosehäufigkeit gegen den Originalausstrich desselben Knochenmarks ?

LAJTHA berichtet, daß sich die Zählung der Suspension zur Stunde Null vor der Bebrütung nicht signifikant unterscheidet von der Differentialzählung des Knochenmarkbröckchens direkt nach der Sternalpunktion. Diese Angabe deckt sich mit unserem Ergebnis, nach dem unerhebliche, nicht signifikante Unterschiede in der Differentialzählung festgestellt wurden.

Die Mitosehäufigkeit hingegen ist nach dem Suspendieren stark erniedrigt, für die Erythropoese läßt sich sogar ein signifikanter Unterschied ermitteln. Der bei der Kultivierung später nicht erniedrigte wMI spricht jedoch gegen eine Minderung der Vitalität. Wir möchten die verflossene Zeit bei der Manipulation der Zellvereinzelung eher für die Erniedrigung verantwortlich machen, ist doch das vorübergehende Sistieren der mikotischen Vermehrung kurz nach Anlegen der Kulturen als Transplationsschock bekannt (ASTALDI, BOLL).

ALBERT beobachtete bei in Rollröhrchen bewegten Flüssigkeitskulturen eine deutliche Verringerung der Mitosen gegenüber stationären Kulturen. Da zur Herstellung der Suspension das Knochenmarkbröckchen sehr heftig hin und

her bewegt wird, ist hier ein ähnlicher Mechanismus auf der Mitoseaktivität zu postulieren.

2.) Treten unter dem Einfluß der Koagulum- bzw. Flüssigkeitskulturtechnik morphologische Veränderungen an irgendeiner Zellart auf ?

BERMAN (7) schrieb in einer zusammenfassenden Arbeit über Gewebezüchtungsmethoden in der Hämatologie, daß die Zellen in flüssigen Medien leicht morphologisch geschädigt und dadurch schwer zu differenzieren sind. Wir können diese Erfahrung nicht bestätigen. Die morphologischen Veränderungen, die mit zunehmender Kultivierungszeit auftraten, fanden sich gleichermaßen bei der Koagulumkultur wie auch bei der Flüssigkeitskultur. Allerdings ist hier eine gute Ausstrichtechnik von Bedeutung.

3.) Ändert sich die prozentuale Verteilung der Zellen in der Koagulumkultur gegenüber der Flüssigkeitskultur ?

Es ließ sich keine signifikante Änderung der Zellverteilung in beiden Kulturtechniken nachweisen. Auffällig ist nur die starke Verminderung der reifen Erythroblasten der Flüssigkeitskultur gegenüber der Koagulumkultur. LAJTHA berichtet, daß die Lebenserwartung der kernhaltigen roten Zellen in der Flüssigkeitskultur im Verhältnis zu den weißen Zellen sehr gering ist, so daß sich nach 72 h nur noch vereinzelt rote kernhaltige Zellen finden lassen. Diese Beobachtung können wir bestätigen, auch mit dem über der Koagulumkultur liegenden G/E Indices (Abb. 18).

Bei BOLL findet sich ein Hinweis auf eine gewisse Entkernungshemmung der reifen Erythroblasten in der Koagulumkultur, So läßt sich mit gewisser Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die

Erythroblasten in der Flüssigkeitskultur schneller zu Erythrocyten ausreifen, während in der Koagulumkultur - vielleicht durch Fehlen der in vivo ebenso wie in der Flüssigkeitskultur vorhandenen Strömung - die Entkernung gehemmt ist.

Die stärkere Zunahme der segmentkernigen neutrophilen Granulocyten in der Flüssigkeitskultur findet ihre Erklärung in der Verminderung der reifen Erythroblasten. Sie ist also nur relativ. Bei OSGOOD (38) finden sich die gleichen Ergebnisse.

4.) Läßt sich ein Unterschied in der Mitosehäufigkeit und der Mitosephasenverteilung bei den verschiedenen Kulturmethoden feststellen ?

Bei den Mitoseindices der Erythroblasten findet sich im Verlauf der Kulturzeit kaum ein nennenswerter Unterschied bei beiden Kulturmethoden. Es fällt nur auf, daß bei der Flüssigkeitskultur auch noch nach 72 h Mitosen gefunden wurden. Die Mitoseindices der Granuloblasten hingegen liegen in der Flüssigkeitskultur höher als die in der Koagulumkultur. Bei BERMAN und später auch bei BOLL findet sich die Angabe, daß bei Flüssigkeitskulturen fast keine Mitosen mehr vorkommen sollen. Auch bei OSGOOD finden sich Angaben über eine deutliche Verringerung der Mitosen der Flüssigkeitskultur gegenüber einer Koagulumkultur. Die von uns jetzt angewandte Technik der Flüssigkeitskultur scheint also besser geeignet, die vitalen Vorgänge des menschlichen Knochenmarks aufrechtzuerhalten. Sie ist der Koagulumtechnik in der Modifikation von BOLL zumindest ebenbürtig.

Zusammenfassung.

Um den Unterschied zwischen der Koagulumkulturmethode und der Suspensionskulturmethode von Knochenmark zu prüfen, wurden Kulturausstriche differenziert und die Ergebnisse in Bezug auf morphologische Veränderungen an den Zellen, Änderungen in der Differentialverteilung der Zellen, in der Mitosehäufigkeit und der Mitosephasenverteilung bei beiden Kulturmethoden verglichen. Auf Grund dieser Differentialzählungen bis zu drei Tagen läßt sich aussagen, daß bei den verwendeten Kulturbedingungen keine nennenswerten Abweichungen auftraten. Entgegen früheren Ergebnissen von BOLL fanden sich in der Flüssigkeitskultur sogar mehr Mitosen und die Erythroblastenentkernung schien nach den Differentialzählungen weniger behindert.

Literaturangaben.

1.) Albrecht, M. und J. von Riesen — Einführung in die Zelldiagnostik des menschlichen Knochenmarks u.Blutes. Walter de Gruyter, Berlin (1957)

2.) Albert, v.H.H. und Zickgraf, H. — Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung "hypersplener" Milzen. II.Experimentelle Untersuchungen an der Flüssigkeitskultur. Blut 12 : 104 (1966)

3.) Astaldi, G. and Tolentino, P. — Studies in vitro on the maturation of erythroblasts in normal and pathological conditions. J.clin.Path. 2 : 217 (1949)

4.) Astaldi, G. and Franko, J. — Studies on the possibility of using protamin sulfate in the technique of vitro cultures of haematopoetic tissues. Experimentia 6 : 231 (1950)

5.) Astaldi, G. Franko, J. and Mauri, C. — New criteria for the evaluation of the bone marrow cells mitotic activity. Sang 21 : 378 (1950)

6.) Astaldi, G. and Cardinali, G. — On the relationship between proliferation and maturation of bloodforming cells surviving in vitro. Haem. Latina II : 17 (1959)

7.) Berman, L. Stulberg, C.S. and Ruddle, F.H. — Long-term tissue culture of human bone marrow. I.Report of isolation of a strain of cells resembling epithelial cells from bone marrow of a patient with carcinoma of the lung. Blood X, 9 : 896 (1955)

8.) Berman, L. — Review of methods for studying maturation of human erythroblasts in vitro : evaluation of a new method of culture of cell suspension in a clot-free medium. Blood 14 : 194 (1959)

9.) Bessis, M. — Cytology of the blood and blood forming organs. Verlag Grune & Stratton New York und London (1956)

10.) Boll, J. — Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. 1. Granuloblastenmitosen. Folia Haematologica, NF, 3 : 58 (1958)

11.) Boll, J. und Fuchs, G. — Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro. Blut 7 : 257 (1961)

12.) Boll, J. und Fuchs, G. — Unterschiedliche Strahlenwirkung auf Leuko- und Erythropoese in vitro. 8.Kongr. Eur.Ges.Haematol. Wien 1961 S.Kafger Verlag, Basel und New York 339 (1962)

13.) Boll, J. — Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. V.Mitt. : Verhalten der Granuloblasten während der Interkinese. Blut 11 : 326 (1965)

14.) Boll, J. — Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer Verlag, Heidelberg (1966)

15.) Boll, J. — Die Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese. Fortschr. Med. 4 : 127 (1966)

16.) Boll, J. — Die Regeneration in der Granulopoese. Verh.d.Dt.Ges. für Pathologie 50. Tag, Heidelberg 1966

17.) Boll, J. und Fuchs, G. — Cell reneval in granulopoesis. Exp. Haematol. 12 : 85 (1967)

18.) Boll, J. und Mersch, G. — Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17 : 193 (1968)

19.) Boll, J. und Mersch, G. — Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulocytopoese in vitro. Blut 19 : 257 (1969)

20.) Boll, J. — Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulopoese. Fol. haemat. (Leipzig) 91, 2-3 : 172 (1969)

21.) Burke, W.T. und Harris, C.
The changing cellular distribution in bone marrow of the normal albino rat between one and fifty weeks of age.
Am. J. Path. 33, 5 : 931 (1957)

22.) Burke, W.T. und Harris, C.
Total cell counts of the bone marrow of normal albino rats from one to fifty weeks of age.
Blood 14, I : 409 (1969)

23.) Carrel, A. und Ebeling, A.H.
Pure cultures of large mononuclear leukocytes.
J. exp. 36 : 365 (1922)

24.) Cronkite, E.P. Fliedner, T.M. Bond, V.P. and Robertson, J.S.
Anatomic and physiologic facts and hypotheses about haematopoetic proliferating systems.
In. : F.Stohlmann "The Kinetics of cellular proliferation".
Grune & Stratton, New York und London (1959)

25.) Fieschi, A. und Astaldi, G.
La cultura in vitro del midollo osseo.
Haematol. 8 : 173 (1946)

26.) Geigy Dokumenta
Wissenschaftliche Tabellen
J.R. Geigy, Basel 6 : 170 22 (1960)

27.) Heilmeyer, L. und Hittmair, A.
Hdb.d.Ges.Haematol. Bd. 1
Urban und Schwarzenberg,München (1957)

28.) Heilmeyer, L.
Hdb.d.Ges.Haematol. II
Urban und Schwarzenberg,München (1960)

29.) Hulse, E.V.
Quantitative cell counts of the bone marrow and blood and their secular variations in the normal adult rat.
Acta haemat. 31 : 50 (1964)

30.) Killmann. S.A. Cronkite, E.P. Fliedner, T.M.and Bond, V.P.
Mitotic indices of human bone marrow cells. I.Number and cytologic distribution of mitoses.
Blood 19 : 743 (1964)

31.) Killmann, S.A. Cronkite, E.P. Bond, V.P. and Fliedner, T.M.
Mitotic indices of human bone marrow cells. III. Duration of erythrocytic and granulocytic proliferation computed from mitotic indices.
Blood 24 : 267 (1964)

32.) Lajtha, L.G. An inhibitory factor in pernicious anaemia serum.
Clin. Sci. 9 : 287 (1950)

33.) Lajtha, L.G. Culture of human bone marrow in vitro. The reversibility between normoblastic and megaloblastic series of cells.
J. clin.path. 5 : 67 (1952)

34.) Lajtha, L.G. The culture of bone marrow cells in vitro.
Brit. med. Bull. 15 : 47 (1959)

35.) Osgood, E.E. and Muscowitz, A.N. Culture of human bone marrow. Preliminary report.
J. Amer. Med. Ass. 106 : 1888 (1936)

36.) Osgood, E.E. and Brownlee, I.E. Culture of human bone marrow. A simple method for multiple cultures.
J. Amer. Med. Ass. 107 : 123 (1936)

37.) Osgood, E.E. and Brownlee, I.E. Culture of human bone marrow. Details of a simple method.
J. Amer. Med. Ass. 108 : 1793 (1937)

38.) Osgood, E.E. Culture of human bone marrow.
J. Amer. Med. Ass. 109 : 933 (1932)

39.) Pulvertaft, R.J.V. and Humble, J.G. Culture de moelle osseuse sur lames tournantes.
Rev. d'hémat. 11 : 349 (1956)

40.) Reisner, Jr.E.H. Tissue culture of bone marrow. II. Effect of steroid hormones on hematopoiesis in vitro.
Blood 27 : 480 (1966)

41.) Woodliff, H.J. Serum agar cultures of blood and bone marrow cells.
Acta haemat. 25 : 300 (1961)

Lebenslauf.

Am 28. Juni 1943 wurde ich als Sohn des Stabsarztes Dr. med. Hans-Joachim Ehrlich und seiner Ehefrau Vera geb. Fiedler in Arnstadt (Thüringen) geboren. Seit 1949 besuchte ich sechs Jahre lang die 13. Grundschule im Bezirk Neukölln und wechselte dann auf die 1. OWZ, die heutige Albrecht-Dürer-Schule über. Im Mai 1962 legte ich dort die Reifeprüfung ab und begann anschließend im Sommersemester 1962 mit dem Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. Im April 1963 bestand ich dort das Vorphysikum und im April 1965 das Physikum. Meine klinischen Studien setzte ich ununterbrochen an der Freien Universität Berlin fort und beschloß sie im Oktober 1968 mit dem Staatsexamen. Danach arbeitete ich sechs Monate als Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses Britz, drei Monate als Medizinalassistent auf der Chirurgischen Abteilung des St. Joseph-Krankenhauses Berlin und bin zurzeit als Assistenzarzt auf der Chirurgischen Abteilung des Kantonsspitals Glarus (Schweiz) tätig.
Am 24.September 1970 erhielt ich die Bestallung als Arzt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Frau Prof.Dr. Boll für Überlassung des Themas und für ihre freundliche Unterstützung meiner Arbeit herzlichst zu danken.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33